

REPOSITORIO ACADÉMICO DIGITAL INSTITUCIONAL

“VALIDACIÓN DE UN MÚLTIPLEX DIAGNÓSTICO PARA IDENTIFICAR CANDIDA ALBICANS, CANDIDA GLABRATA, CANDIDA PARAPSILOSIS EN TRACTO UROGENITAL”

Autor: Shumeyker Susmith Franco Gonzalez

Tesis presentada para obtener el título de:
Licenciado en Médico General

Nombre del asesor:
Dra. Mercedes Piedad De León Bautista

Este documento está disponible para su consulta en el Repositorio Académico Digital Institucional de la Universidad Vasco de Quiroga, cuyo objetivo es integrar, organizar, almacenar, preservar y difundir en formato digital la producción intelectual resultante de la actividad académica, científica e investigadora de los diferentes campus de la universidad, para beneficio de la comunidad universitaria.

Esta iniciativa está a cargo del Centro de Información y Documentación “Dr. Silvio Zavala” que lleva adelante las tareas de gestión y coordinación para la concreción de los objetivos planteados.

Esta Tesis se publica bajo licencia Creative Commons de tipo “Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada”, se permite su consulta siempre y cuando se mantenga el reconocimiento de sus autores, no se haga uso comercial de las obras derivadas.





**Escuela de
Medicina**

**ESCUELA DE MEDICINA
UNIVERSIDAD VASCO DE QUIROGA**

**Validación de un Múltiplex Diagnóstico para
Identificar *Candida albicans*, *Candida
glabrata*, *Candida parapsilosis* en Tracto
Urogenital**

**TESIS PROFESIONAL DE LICENCIATURA
PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
MÉDICO GENERAL**

PRESENTA:

SHUMEYKER SUSMITH FRANCO GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MERCEDES PIEDAD DE LEÓN BAUTISTA

Morelia, Michoacán. 2021

DEDICATORIA

A mi mamá Licia.

AGRADECIMIENTO

Le doy gracias a mis padres José Luis y Leticia por apoyarme en todo momento por los valores que me han incluido, por la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por su excelente ejemplo.

A mi Familia Ernesto, Oris, Paty, Luis, Vicky y Valentina, por representar la unidad familiar y llenar mi vida de alegría y amor cuando más lo he necesitado, por ser parte importante de mi vida y apoyarme en las buenas y en las malas sobre todo por su paciencia y amor incondicional.

A mis abuelos Alicia, Dolores y Elvira que aunque ya no se encuentran físicamente con nosotros siempre estarán presentes en nuestros recuerdos, por haber creído en mí hasta el último momento.

Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mis profesores: Dra. Mercedes de León por haber compartido conmigo sus conocimientos y sobre su amistad

A mis mejores amigos Kevin y Alexel por haberme sido unos excelentes amigos, por haberme tenido la paciencia necesaria cada vez que entraba en una crisis de estrés, por motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación, mis amigos de la Carrera Maqui, Mizzy, Frida, Alex, Alexis, Carmina, Ale por confiar y creer en mí y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré. Y a mis amigos del Servicio Social Karla, Nina, Víctor y Erandy por ser parte trascendental de una de las etapas de desarrollo profesional más importante y al mismo tiempo aportar un conocimiento aun mayor sobre diferentes áreas de la salud y darme su apoyo.

De igual manera se le distingue un agradecimiento al Laboratorio Estatal de Salud Pública Morelia por la donación de un control positivo de *Candida albicans*.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Glosario	2
Resumen	4
Abstract	5
Introducción	7
<i>Candida spp.</i> y las infecciones de transmisión sexual	7
¿Qué es la <i>Candida spp.</i> ?	8
Morfología Celular	8
Factores de adhesión	8
Especies de <i>Candida spp.</i>	9
Enfermedades causadas por <i>Candida spp.</i>	10
Candidiasis Vulvovaginal.	11
Balanitis	11
Candidiasis Sistémica	12
Epidemiología	12
Factores de riesgo	15
Diagnóstico	16
Cultivo	16
Biología Molecular	16
Tratamiento	17
Resistencia	18
Antecedentes	19
Justificación	26
Pregunta de investigación	27
Hipótesis	28
Hipótesis Nula	28
Objetivos	29
Objetivos Generales	29
Objetivos Específicos	29

Materiales y Métodos	30
Diseño de Estudio	30
Tipo y Clasificación de Estudio	30
Definición de unidades de observación	30
Definición de variables y unidades de medición	31
Flujo de trabajo intralaboratorio	32
Metodología	34
Síntesis de controles positivos para la identificación de <i>C. albicans</i>, <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i>.	34
Secuencias	34
Síntesis de plásmidos como controles positivos	34
Estandarización de PCR individual o por especie	36
Estandarización de PCR Múltiple	37
Parámetros de Validación	37
Identificación Muestras positivas a <i>Candida spp.</i>	39
Generar una base de datos con muestras positivas a <i>Candida spp.</i>	40
Consideraciones Éticas	41
Análisis estadístico	42
Resultados	43
Resultados de validación	43
Estandarización de PCR individual o por especie y duplicado	43
Parámetros de Validación	45
PCR Multiplex	46
Generar una base de datos con muestras positivas a <i>Candida spp.</i> derivadas de muestras donadas.	48
Base de datos	48
Características generales de la población	51
Detección de especies de <i>Candida</i>	53
Frecuencia de patógenos en coinfección con especie de <i>Candida</i>	57
Análisis de la asociación y riesgo de coinfección con <i>Candida</i> por	64

diferentes patógenos	
Discusión	66
Conclusión	70
Perspectivas del trabajo	71
Limitaciones del proyecto	72
Referencias	73
Anexos	81
Consentimiento Informado	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de especies de <i>Candida</i>	13
Tabla 2. Agentes etiológicos	15
Tabla 3. Tratamiento utilizado en las especies más comunes de <i>Candida spp.</i>	18
Tabla 4. Datos clínicos de 41 RTR con Candidiasis en el Centro de Investigación de Nefrología y Trasplante de riñón, de 2012-2016	22
Tabla 5. Distribución de especies de <i>Candida</i> oral	23
Tabla 6. Variables y Unidades de Medida	31
Tabla 7. Oligonucleótidos sintéticos para la PCR simple y múltiple	34
Tabla 8. Temperatura para PCR	36
Tabla 9. Tabla ilustrativa de la base de datos de <i>Candida spp.</i>	40
Tabla 10. Oligonucleótidos sintéticos para la PCR simple y múltiple	45
Tabla 11. Base de datos con muestras positivas a <i>Candida spp.</i>	49
Tabla 12. Frecuencia de especies de <i>Candida</i> en la población de estudio	55
Tabla 13. Frecuencia de patógenos en coinfección según el sexo de la población de estudio	58
Tabla 114. Asociación y riesgo de infección por patógenos en coinfección con <i>Candida albicans</i>	65

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribución de <i>Candida spp.</i> aislado de acuerdo al tipo de muestras	20
Gráfico 2. Incidencia anual de episodios de candidemias por especie.	21
Gráfico 3. Correlación entre PCR y cultivo para la detección de cada una de las especies de <i>Candida</i>	24
Gráfico 4. Diseño de plásmidos <i>In silico</i>	35
Gráfico 5. Distribución de la edad según el sexo del paciente.	51
Gráfico 6. Frecuencia el sexo de la población de estudio.	52
Gráfico 7. Frecuencia de las áreas anatómicas de las que se obtuvo la muestra.	52
Gráfico 8. Proceso de selección de las muestras e identificación de las muestras positivas a alguna especie de <i>Candida</i> .	53
Gráfico 9. Frecuencia <i>Candida albicans</i> en la población de estudio	54
Gráfico 10. Frecuencia <i>Candida parapsilosis</i> en la población de estudio	54
Gráfico 11. Frecuencia <i>Candida glabrata</i> en la población de estudio	55
Gráfico 12. Frecuencia <i>Candida albicans</i> según el sexo del paciente	56
Gráfico 13. Frecuencia <i>Candida glabrata</i> según el sexo del paciente	56
Gráfico 14. Frecuencia <i>Candida parapsilosis</i> según el sexo del paciente	57
Gráfico 15. Frecuencia casos positivos a <i>Candida</i> y con coinfección con algún patógeno incluido en nuestro estudio	57
Gráfico 16. Frecuencia <i>Ureaplasma spp.</i> en la población de estudio	60
Gráfico 17. Frecuencia <i>Chlamydia trachomatis</i> en la población de estudio	60
Gráfico 18. Frecuencia <i>Mycoplasma spp.</i> en la población de estudio	61
Gráfico 19. Frecuencia MCV en la población de estudio	61
Gráfico 20. Frecuencia <i>Treponema pallidum</i> en la población de estudio	62
Gráfico 21. Frecuencia <i>Haemophilus spp.</i> en la población de estudio	62
Gráfico 22. Frecuencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en la población de estudio	63

Gráfico 23. Frecuencia del Virus de Papilloma Humano en la población de estudio **63**

ÍNDICE DE IMÁGENES E ILUSTRACIONES

Imagen 1. Distribución de CVV en diferentes países	14
Imagen 2. Estandarización Temperatura de <i>C. albicans</i> .	43
Imagen 3. Estandarización Temperatura de <i>C.parapsilosis</i>	44
Imagen 4. Estandarización Temperatura de <i>C.glabrata</i>	44
Imagen 5. Robustez utilizando cambios en la temperatura en 54°C, 55°C y 56.5°C	46
Imagen 6. PCR Multiplex	47
Imagen 7. Repetibilidad	48
Ilustración Consentimiento Informado	81

ÍNDICE DE FLUJOS

Flujo 1. Flujo de trabajo intralaboratorio	33
Flujo 2. Flujo de identificación de muestras positivas	39

ABREVIATURAS

Ac.	Ácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool / Herramienta básica de búsqueda de alineación local.
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. lusitane</i>	<i>Candida lusitane</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
RTR	Receptor de Transplante Renal
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CVV	<i>Candidiasis VulvoVaginal</i>
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genómico
GPI	Glucosilfosfatidilinositol
HSV	Herpes Simplex
ITS	Infecciones de Transmisión Sexual
MCV	Virus del Molusco Contagioso
NAATS	Nucleic Acid Amplification Test / Prueba mediante amplificación de Ácidos Nucleicos
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
Bp	Pares Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SAP	Aspartil proteinasa
TV	<i>Trichomonas vaginalis</i>
VPH	Virus papiloma Humano

GLOSARIO

- **Adhesión celular:** Capacidad de la célula de unirse a otros elementos celulares.
- **Alineamiento:** Forma de comparar las secuencias de cadenas de ADN, ARN o de estructuras proteicas, para distinguirse sus zonas similares.
- **Biología Molecular:** Disciplina científica que tiene como objetivo el estudio de los procesos que se desarrollan en los seres vivos desde un punto de vista molecular.
- **BLAST:** Alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o proteínas. Capaz de comparar una secuencia contra otras de mayor parecido a la seleccionada.
- **Cepa:** Población de microorganismos de una especie, que usualmente se multiplica.
- **Dispareunia:** Dolor al momento de la penetración en la actividad sexual.
- **Disuria:** Molestia, ardor o dolor al orinar.
- **Especie:** Conjunto de organismos o población naturales capaces de cruzar y reproducirse.
- **Estenosis:** Estrechamiento de un orificio o conducto corporal.
- **Estrógeno:** Hormona sexual femenina, que se genera a partir de colesterol
- **Fimosis:** Dificultad de bajar la piel del prepucio, alteración en la piel que rodea el pene.
- **Glucógeno:** es un polisacárido que reserva energía, formando cadenas de glucosa, no es soluble en agua por lo que forma dispersiones coloidales.
- **Heterogénea:** Compuestos de partes diferentes de la naturaleza.
- **Hidrolítico:** de hidrólisis/ reacción en la que las moléculas de agua y otras pueden formar una reacción.
- **Infecciones Transmisión Sexual:** Infecciones que se contagian de una persona a otra durante alguna actividad sexual.

- **Morbilidad:** Cantidad de personas enfermas o afectadas por una enfermedad específica.
- **NAATS:** Prueba de Amplificación de Ácidos Nucleicos. Prueba que detecta material genético, e identificar especies o subespecies de organismos
- **Nucleótidos:** unidades y productos que se unen y forman al ARN y ADN; en formas de largas cadenas.
- **Oligonucleótidos:** Secuencia de DNA generalmente de nucleótidos sintetizados artificialmente para tener una secuencia.
- **Panel:** Técnica de investigación del área cuantitativa que obtiene información de una muestra de población.
- **Polimórfico:** Si más de una cadena que contiene un mismo gen ocupa la misma posición en un cromosoma.
- **Plásmidos:** Molécula pequeña de ADN circular que a menudo se encuentra en bacterias y otras células; separados del cromosoma bacteriano y se replica independientemente de ella.
- **Prurito:** picazón y sensación incómoda e irritante en la piel, que provoca rascar.
- **Secuencias:** Es una sucesión de letras representando la estructura primaria de una molécula real o hipotética de ADN o banda, con la capacidad de transportar información.
- **Sexo:** conjunto de características de los individuos de una especie que los divide en masculino y femenino

RESUMEN

Antecedentes: *Candida spp.* es un hongo con más de 150 especies reportadas, y es el principal agente etiológico de las micosis oportunistas. En las últimas tres décadas se ha reportado un incremento significativo de candidosis localizadas y sistémicas; sin embargo, la búsqueda intencionada para elucidar la especie de *Candida* en la práctica es nula, debido a su localización ubicua, aunado a la falta de alternativas diagnósticas, que en conjunto deriva en resistencia antimicrobiana, infecciones persistentes y complicaciones mortales.

Objetivo: Validar un múltiplex diagnóstico asequible, robusto, específico y repetible para la identificación de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, utilizando muestras de zonas urogenitales de pacientes mexicanos.

Metodología: Mediante herramientas *in silico* se diseñaron controles positivos para la identificación específica de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*. Se validaron los parámetros de reproducibilidad, robustez y especificidad. Posteriormente, mediante diseño prospectivo y transversal, se incluyeron 87 muestras positivas a *Candida spp.* Estadísticamente la edad, sexo, patógenos concomitantes y el sitio anatómico fueron analizados.

Resultados: Se demostró que la validación de la prueba múltiple permite la detección de *C. albicans*, *C. glabrata*, y *C. parapsilosis* en una sola reacción. Estadísticamente, para el análisis de la edad, se incluyeron 62 casos de pacientes con edad media de 35.5 ± 6.6 años. 40.3% (n=25) fueron del sexo femenino y 59.7% (n=37) fueron del sexo masculino. Se detectaron 41 casos positivos a alguna de estas tres especies de cándida (66.1%), de los cuales, 37 casos (59.7%) fueron *Candida albicans*, 4 casos (6.5%) *Candida parapsilosis* (6.5%) y 2 casos (3.2%) *Candida glabrata*. Todas las especies de cándida fueron más frecuentes en el sexo masculino. Las coinfecciones más frecuentes fueron: VPH 37.1% (n=23), *Haemophilus spp.* 12 (19.4%), *Ureaplasma spp.* 12.9% (n=8) y *Chlamydia trachomatis* 6.6% (n=4).

Conclusión: La identificación de las especies de cándida es indispensable, debido a las alarmas sanitarias originadas por la resistencia antimicrobiana. El panel validado en este proyecto ofrece la oportunidad de identificar *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* con el objetivo de ofrecer un tratamiento oportuno y sensible a los pacientes, no solo en zona urogenital, sino también en otras.

ABSTRACT

Background: *Candida spp.* is a fungus with more than 150 reported species, and it is one of the principal etiological agents of opportunistic mycoses. In the last three decades, a significant increase in localized and systemic candidiasis have reported; however, the intentional screening to elucidate the candida species is underestimated due to its ubiquitous location and the lack of diagnostic alternatives; altogether lead to antimicrobial resistance, persistent infections, and high rates of mortality.

Objective: Validate an affordable, repeatable, robust, and specific multiplex PCR test, to identify *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, in urogenital samples from Mexican patients.

Methods: Using in silico tools, we designed synthetic positive controls to identify *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis*. The parameters such as repeatability, robustness and, specificity were experimentally validated. Subsequently, through a prospective and cross-sectional design, 87 positive samples for *Candida spp.* were included. The Age, sex, concomitant pathogens, and anatomical sites were statistically analyzed.

Results: We demonstrated that the multiplex PCR test detects *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis* in a single reaction. Statistically, for the age analysis, 62 cases of patients with a mean age of 35.5 ± 6.6 years were included. 40.3% (n = 25) were female and 59.7% (n = 37) were male. 41 positive cases were detected for any of these three species of *Candida* (66.1%), of which 37 cases (59.7%) were *Candida albicans*, 4 cases (6.5%) were *Candida parapsilosis* (6.5%) and, 2 cases (3.2%) *Candida glabrata*. All candida species were more frequent in males. The most frequent coinfections were: HPV 37.1% (n = 23), *Haemophilus spp.* 12 (19.4%), *Ureaplasma spp.* 12.9% (n = 8) and *Chlamydia trachomatis* 6.6% (n = 4).

Conclusion: The identification of candida species is necessary due to the health alarms caused by antimicrobial resistance. Our validated panel offers the opportunity to identify *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis* to choose a

timely and sensitive treatment for the patients, not only in the urogenital areas but also in others.

Validación de un Múltiplex Diagnóstico para Identificar *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* en Tracto

INTRODUCCIÓN

***Candida spp.* Y LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL**

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) representan un problema de salud muy importante en todo el mundo (Coleman JS, Gaydos CA, Witter F., 2013); de las cuales las infecciones más comunes son causadas por patógenos como *Chlamydia trachomatis* (CT); *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Herpes simple* (HSV) y *Trichomonas vaginalis* (TV) (Huo, H. F., Yang, Q., & Xiang, H., 2019).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define las ITS como enfermedades transmitidas por contacto o comportamiento sexuales directos o indirectos consecuencias en la salud física, social y psicológica (Nguyen, S. H., Dang, A. K., Vu, G.T., Nguyen, *et al.*, 2019). En el tema de las candidiasis, algunos autores denominan a la *Candida* como una levadura que produce factores de virulencia que favorecen su colonización e infección a través del cambios fenotípicos que le proporcionan flexibilidad a este patógeno, permitiéndole adaptarse a cualquier medio hostil, por lo que puede ocasionar varias patologías; mientras que otros autores mencionan que las complicaciones que provoca este hongo pueden favorecer la adquisición de alguna ITS (Calderone, R. A., & Fonzi, W. A., 2001). Se ha documentado que la mayoría de la gente porta una sola cepa de *Candida* en diferentes partes del cuerpo por lo cual, no es correcto denominar que la *Candida spp.* ocasiona ITS puesto que es un agente que se encuentra de manera habitual en alguna de las áreas anatómicas humanas (Bernabé, P., Becherán, L., Cabrera-Barjas, G., *et. al* 2020).

¿QUIÉN ES *Candida spp*?

Candida spp. es un hongo que se ha diversificado en más de 150 especies heterogéneas, de las cuales aproximadamente 50 se han aislado en algún cavidad el cuerpo humano; de estas, las más frecuentes son *C. albicans* en un 85%; *C. glabrata* en un 10% y *C. parapsilosis* 5% (Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., *et al.*, 2011).

Candida es el principal agente etiológico de las micosis oportunistas nosocomiales asociadas a altas tasas de mortalidad, primordialmente en pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades subyacentes (Taira, C. L., Okay, T. S., Delgado, A. F.*et al.*, 2014). Se ha descrito que el principal microambiente de *Candida* es el tracto gastrointestinal, (Miró, M. S., Rodríguez, E., Vigezzi, C., Icely, *et al.*, 2017) y puede sobrevivir fuera del hospedero en zonas húmedas y oscuras.

▪ MORFOLOGÍA CELULAR

Candida spp. es un hongo unicelular polimórfico, es decir, levaduras, gemación ovoide, o hifas (Mayer FL, Wilson D, Hube B., 2013). Miden aproximadamente 2-7 µm de diámetro; presentan hifas a partir de las levaduras, estas se desarrollan por una proyección de tubo germinal que se alargan y empiezan a ramificarse con septos definidos que dividen a las hifas en unidades fúngicas separadas, pero a diferencia de *C. glabrata*, *C. albicans* no es polimórfica por lo que crece solo en blastoconidios (Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D & Azeredo, J., 2011)

▪ FACTORES DE ADHESIÓN

Los factores de virulencia de *Candida spp.* incluyen la capacidad de exhibir transiciones, se adhieren a los tejidos del huésped y van desarrollándose biopelículas que secretan enzimas hidrolíticas; por ejemplo, puede presentar la aspartil proteasa (SAP), la cual se encarga de degradar proteínas en los sitios de

lesiones y facilita de esta forma su invasión en el epitelio (Alves CT, 2014). *Candida spp.* tiene varias adhesinas que ayudan a la adherencia de otras células como la SAP (Mayer FL, Wilson D, Hube B., 2013).

La adherencia a las superficies de los catéteres urinarios permanentes y una variedad de plásticos también se han demostrado y pueden contribuir a las infecciones posteriores, la adherencia se considera un factor crucial ya que permite a la levadura adherirse al cuerpo e iniciar una proliferación del patógeno (Fisher JF, Kavanagh K, Sobel JD, Kauffman CA, *et al.*, 2011). Esto ocurre por la transición morfológica entre las formas de levaduras e hifas; la formación de las hifas está relacionada con expresión de genes que codifican la virulencia junto con varias proteínas (Mayer FL, Wilson D, Hube B., 2013)

- **ESPECIES DE *Candida spp.***

C. albicans se considera la especie más frecuente, sin embargo, se ha documentado un aumento en frecuencia de *Candida* no albicans, de las cuales su especie más representativa es la *C. glabrata*. (Alves CT, 2014). Convirtiéndose en la segunda especie más importante (Reyes-Montes, M., Acosta-Altamirano, G., Duarte-Escalante, *et al*, 2019).

C. glabrata inicialmente fue clasificada en 1917 como un *Cryptococcus glabratus*, posteriormente en 1938 como *Torulopsis glabrata*, esto porque sus blastoconidias no producen hifas verdaderas y en 1978 se consideró dentro de *C. glabrata*, que es una levadura no filamentosa con alta virulencia, una característica importante de esta especie de *Candida* es que asimila azúcares e inicia una multiplicación cuando se encuentra a una temperatura de 37 °C, esto facilita la resistencia principalmente con los fármacos -azoles (Tapia P, 2008).

C. parapsilosis en 2009 se describió como un hongo, con 8 pares de cromosomas, el cual presenta un tamaño de 13 millones de pares de bases (MBp); fenotípicamente no hay registro de que presente hifas verdaderas, sino formas de cráter o concéntricos y presente pseudohifas; estas contribuyen a la virulencia y son más resistentes a los macrófagos produciendo daños más graves

en las células del huésped (Tóth, R., Nosek, J., Mora-Montes, H. M., Gabaldon, T., *et al.* 2019).

C. tropicalis fue aislada en 1910 en un paciente con bronquitis, en ese entonces se le conocía como *Oidium tropicale*. Es una levadura que en un cultivo se puede ver de color blanco, con textura cremosa, esto permite que se pueda distinguir de otras especies de *Candida*, morfológicamente tiene formas blastoconidios esféricos u ovoides de aproximadamente 4-8 x 5-11 μm , estos presenta pseudohifas en cadenas ramificadas; en las características bioquímicas esta especie de *Candida* tiene la capacidad fermentar galactosa o sacarosa. (Zuza-Alves, D. L., Silva-Rocha, W. P., & Chaves, G. M. 2017)

C. krusei, al igual que las demás especies es un hongo oportunista, a diferencia este es una de las especies con mayor morbilidad y mortalidad dependiendo de la zona en la que genere la infección, es un hongo diploide, al igual que *C. tropicalis* es usada para fermentar algunas frutas y productos lácteos (Elicharova, H., Herynkova, & P., Zimmermannova, *et al.*, 2019).

C. lusitanae, es una de las especies de *Candida* que rara vez se puede encontrar, esta especie es mayormente localizada en áreas urogenitales en pacientes inmunocomprometidos, como son en caso de pacientes con antecedentes de neoplasias o en tratamiento de corticoesteroides (Wawrysiuk, S., Rechberger, T. & Futyma, K. *et al.*, 2018).

ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Candida spp.*

En los últimos 30 años ha habido un incremento significativo en las infecciones fúngicas provocadas por *Candida*, las cuales pueden afectar cabello, uñas, membranas, mucosas sistémicas y pueden involucrar algunos de los órganos principales (Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D & Azeredo, J., 2011). Aunque la patogenia de diseminación de la *Candida* no se comprende por completo, se cree que el primer paso para presentar una infección es la colonización por alguna de las especies de *Candida* y desde hace tiempo se

describió la necesidad de ampliar la capacidad de identificación de levaduras para facilitar el diagnóstico (Eggimann, P., & Pittet, D. 2014).

Se ha descrito que *Candida* puede ingresar por vías dérmicas, mucosas o parenterales, causando dos tipos principales de infecciones como son, las infecciones superficiales (orales o vaginales) e infecciones sistémicas, las cuales representan tasas de mortalidad altas (Mayer FL, Wilson D, Hube B., 2013).

▪ **CANDIDIASIS VULVOVAGINAL**

A nivel mundial una de las infecciones más comunes del tracto urogenital femenino es la causada principalmente con algún tipo de *Candida* (Lavazzo, C., Gkegkes, I. D., Zarkada, I. M., 2002). La tasa de colonización varía dependiendo del paciente ya que son más susceptibles de padecerla aquellos pacientes inmunocomprometidos, tales como, pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 o 2, mujeres embarazadas o con factores de riesgo como el consumo de anticonceptivos orales o antibióticos de amplio espectro (Alves CT, 2014). El aumento del pH vaginal, reacciones alérgicas, traumatismo, factores térmicos, hormonales, entre otros, son también factores asociados a estas infecciones (Pineda-Murillo, J., Cortes-Figueroa, A.A., Uribarren-Berrueta T., & Olivares, L.R, 2017).

Clínicamente podemos encontrar a las pacientes con inflamación en área vulvar o vaginal, prurito en área genital, ardor vulvar, dispareunia, disuria y olor desagradable del área genital y salida de flujo con aspecto a “requesón” (Pineda-Murillo, J., Cortes-Figueroa, A.A., Uribarren-Berrueta T., & Olivares, L.R, 2017).

▪ **BALANITIS**

La balanitis o balanopostitis es causada en un 35% por *Candida* spp; en el caso de los hombres, es aún menor la información sobre colonizaciones de *Candida* en área genital (Lisboa, C., Santos, A., Dias, C., Azevedo, F., Pina-Vaz, C., & Rodrigues, A., 2010). Esta patología es una dermatosis inflamatoria con irritación

de la piel, su principal síntoma es la presencia de una placa esclerótica blanca que se encuentran en el prepucio y glande del pene, provoca fimosis, estenosis del meato, erecciones dolorosas y dificultades con la actividad sexual. La balanitis se limita en la superficie interna de la mucosa y unión mucocutánea del área prepuccial externa (Nguyen, A., & Holland, A., 2020).

La balanitis causada por *Candida* se desarrolla principalmente en hombres mayores de 40 años y con Diabetes Mellitus (Lisboa, C., Santos, A., Dias, C., Azevedo, *et al.*, 2010),

▪ **CANDIDIASIS SISTÉMICA**

Es una enfermedad nosocomial con alta morbilidad y mortalidad causada por patógeno resistente, es una infección de resección prolongada que se presenta inicialmente en pacientes inmunosuprimidos o adultos mayores, y su diagnóstico se considera un poco difícil esto por la falta síntomas o signos patognomónicos (Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., *et al.*, 2018). Se pueden presentar síndromes febriles sin focos en pacientes hospitalizados (Víctor, Hernández, Gina, & Méndez, Rafael, 2018). En la mayoría de los casos estas infecciones se presentan posteriores al alta hospitalaria, con mayor incidencia en aquellos pacientes que presentaban procedimientos invasivos como catéteres, sonda y alimentación parenteral (D. J. Pedraz, Y. Delgado-Jimenez, S. Perez-Gala y col., 2009). En el caso de los pacientes que prestan candidemias puede manifestar sepsis o shock séptico; en la esofagitis puede presentar odinofagia, disfagia y dolor retroesternal, o en caso de las candidiasis sistémicas nerviosa puede presentar meningitis (Víctor, Hernández, Gina, & Méndez, Rafael. 2018).

EPIDEMIOLOGÍA

En al menos 39 países se ha descrito que las 5 principales especies de *Candida* aisladas son *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, de

la cual *C. albicans* es el patógeno más común de forma general en todo el mundo (Guinea J., 2014).

En México la candidiasis o candidosis es una de las enfermedades que no es de reporte obligatorio, ocupando el noveno lugar en las principales morbilidades del país y en la mayoría de estos casos no se identifica la especie específica (Pineda-Murillo, J., Cortes-Figueroa, A.A., Uribarren-Berrueta T., *et al.*, 2017).

Uno de los estados fisiológicos más importantes en una mujer es el embarazo, ya que durante este evento se ha reportado una incidencia de candidosis entre el 10 y el 50%, y se ha documentado que en mujeres no embarazadas se aísla en un 20% a un 30%, considerando que el 70% de las mujeres a lo largo de su vida han presentado alguna infección del área genital (Pineda-Murillo, J., Cortes-Figueroa, A.A., Uribarren-Berrueta T., *et al.*, 2017).

En un estudio revisaron publicaciones desde 1991 hasta 2019 que presentaban *Candida* en área Vulvovaginal, área anatómica en donde no se le da mucha importancia médica, notificados de diferentes países, donde se identificaron 287 pacientes con infecciones de *Candida* (Fakhim, H., Vaezi, A., Javidnia, J., *et al* 2020) como se puede ver en la siguiente **tabla 1**.

Tabla 1. Prevalencia de *Candida* especie

<i>Candida</i> species no. (%)	Previous VVC
<i>C. albicans</i> 109 (72.1%)	48 (44.1%)
<i>C. glabrata</i> 21 (13.9%)	5 (23.8%)
<i>C. krusei</i> 8 (5.2%)	2 (25%)
<i>C. tropicalis</i> 5 (3.3%)	3 (60%)
<i>C. africana</i> 3 (1.9%)	–
<i>C. parapsilosis</i> 3 (1.9%)	2 (66.7%)
<i>C. dubliniensis</i> 2 (1.3%)	1 (50%)

Nota: Prevalencia de 287 pacientes con alguna especie de *Candida*. Tomado de Fakhim, H., Vaezi, A., Javidnia, J., *et al.*, 2020

Tabla 2. Agentes Etiológicos

Microorganism	n (%)
Isolated bacteria	1461 (96.63)
<i>Escherichia coli</i>	983 (67.28)
<i>Pseudomonas</i>	104 (7.12)
<i>Klebsiella</i>	94 (6.43)
<i>Enterococcus</i>	88 (6.02)
<i>Proteus</i>	45 (3.08)
<i>Staphylococcus</i>	29 (1.98)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	28 (1.92)
<i>Enterobacter</i>	25 (1.71)
<i>Morganella morganii</i>	19 (1.30)
<i>Citrobacter freundii</i>	18 (1.30)
<i>Providentia</i>	13 (0.89)
<i>Streptococcus</i>	7 (0.48)
Others	8(0.55)
Isolated fungi	51 (3.37)
<i>Candida glabrata</i>	18 (35.29)
<i>Candida albicans</i>	11 (21.57)
<i>Candida krusei</i>	9 (17.65)
<i>Trichosporon beigelli</i>	8 (15.69)
Others	4 (7.84)

Nota: Tomada de: Sierra-Díaz, E., Hernández-Ríos, C. J., & Bravo-Cuellar, A. (2019).

FACTORES DE RIESGO

Diversos factores de riesgo se han relacionado con micosis en el área genital; tales como, el habitar en zonas con climas cálidos y con mayor relevancia, pacientes inmunocomprometidos y las pacientes embarazadas que tienen un incremento en el nivel estrogénico, lo cual se ha correlacionado con un incremento del glucógeno en el tejido vaginal, provocando un ambiente óptimo para la proliferación de esta levadura (Pineda-Murillo, J., Cortes-Figueroa, A.A., Uribarren-Berrueta T., & Olivares, L.R, 2017).

La mayoría de los pacientes que desarrollan una candidosis son mayores de 60 años, con diabetes y obesidad (Lisboa, C., Santos, A., Dias, C., Azevedo, F. *et al.* 2010), caracterizada por una disfunción metabólica en el control de los carbohidratos, proteínas y grasas fomentando la proliferación de este hongo (De la Paz Castillo, K. L., Proenza Fernández, L., Gallardo Sánchez, Y, *et al.*, 2012).

Otros de los pacientes que presentan un riesgo alto de contraer infecciones producidas por *Candida spp.* son aquellos pacientes hospitalizados por un periodo prolongado en los cuales se han realizado algunos procedimientos invasivos como son la alimentación parenteral en pacientes con resistencias múltiples a fármacos

o en pacientes con cáncer (Colombo, A. L., Júnior, J., & Guinea, J. 2017), o en pacientes que poseen catéteres periféricos, los cuales predisponen a infecciones hemáticas o con comorbilidades que requieran de introducir un catéteres, sondas o algún otro método invasivo (Siri, L., Legarraga, P., García, P., *et al.* 2017)

DIAGNÓSTICO

▪ CULTIVO

Como apoyo diagnóstico se cuenta con el cultivo, el cual es considerado el estándar de oro; sin embargo, tiene algunas desventajas como el consumo de tiempo y la falta de especificidad, ya que en la mayoría de los casos, no es posible dilucidar la especie específica en la muestra (Taira, C. L., Okay, T. S., Delgado, *et al.*, 2014). Un cultivo se considera positivo cuando hay un crecimiento de la levadura por impresión directa o por muestreo con hisopo; con número, color y características de la levadura (Lisboa, C., Santos, A., Dias, C., *et al.*, 2010). *Candida* se puede cultivar en agar dextrosa sabouraud, agar papa dextrosa, agar sangre o agar chocolate y estas pueden verse al microscopio como levaduras redondas, pero sin poder identificar con facilidad la especie específica (Pineda-Murillo, J., Cortes-Figueroa, A.A., Uribarren-Berrueta T. *et al.*, 2017). Otro medio de cultivo puede ser el CHROMagar, que permite el aislamiento selectivo de levaduras e identifica simultáneamente colonias de *Candida*, sea la especie que sea (Guilarte C., Pardi G., Perrone M. 2011).

▪ BIOLOGÍA MOLECULAR

Los ensayos mediante amplificación de ácidos nucleicos o NAAT's, son el método diagnóstico más específico, el cual permite identificar las diversas especies de *Candida*, con la ventaja de acortar los tiempos e incrementar la sensibilidad (Pineda-Murillo, J., Cortes-Figueroa, A.A., Uribarren-Berrueta T. *et al.*, 2017). La extracción de ADN tanto de *Candida* como de otros patógenos, se lleva a cabo

utilizando un polisacárido durante la purificación, (Arastehfar, A., Fang, W., Pan, W., Liao, W., Yan, L., *et al.*, 2018) en donde las células son recolectadas por centrifugación; posteriormente, se lleva a cabo una mezcla con los oligonucleótidos. Estas reacciones químicas son colocadas en un termociclador para ejecutar las incubaciones pertinentes y amplificar de manera exponencial el material genético de interés (Reyes-Montes, M., Acosta-Altamirano, G., Duarte-Escalante, E., *et al.*, 2019). Los amplicones de ADN se evalúan mediante separación electroforética en geles de agarosa del 2% al 3 %, (Arastehfar, A., Fang, W., Pan, W. *et al.*, 2018). Una de las mayores ventajas de esta técnica es la posibilidad de discernir entre diferentes especies de *Candida* en una sola reacción, con costos asequibles, tiempos reducidos y robusta metodología. (Bernabé, P., Becherán, L., Cabrera-Barjas, G. *et al.*, 2020).

TRATAMIENTO

Se han desarrollado diferentes agentes antifúngicos contra *Candida spp.* como los azoles, la flucitosina y el ácido bórico. Este hongo es altamente susceptible a los azoles, fármacos comúnmente recetados a los pacientes, debido a la versatilidad en sus presentaciones alópatas; sin embargo, ocasionan un alto grado de resistencia antimicrobiana, contribuyendo a que muchas de las especies de *Candida* sean menos susceptibles a estos fármacos, principalmente la especie *C. glabrata* (Pais, P., Galocha, M., Viana, R., Cavalheiro, *et al.*, 2019). Los azoles se han utilizado desde los años 80s, incluso de manera profiláctica; no obstante, se ha reportado en la literatura que las especies no *C. albicans* son menos susceptibles a los azoles, por esta razón se propone como tratamiento el ácido bórico en su formato granulado o en polvo. En el campo de candidiasis causada por *C. glabrata* se demostró que el Ac. Bórico presentó una respuesta favorable comparado con los azoles (Lavazzo, C., Gkegkes, I. D., Zarkada, I. M., 2002).

- **RESISTENCIA**

Existen mecanismos de resistencia, principalmente ante los azoles y la anfotericina B (Douglas LJ. 2003). Esto depende de la especie, como se puede ver en la **tabla 3**, ya que *C. parapsilosis*, a diferencia de *C. glabrata*, mantiene una tasa susceptible a los azoles, aunque actualmente se recomiendan las equinocandinas como la Caspofungina en la primera línea, en el caso de la Anfotericina B ya no es recomendada en adultos por la nefrotoxicidad que presenta (Arastehfar, A., Fang, W., Pan, W. *et al.*, 2018).

Tabla 3. Tratamiento utilizado en las especies más comunes de *Candida* spp.

Espece / Fármacos	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Referencias
Nistatina	Resistencia	Resistente	N/A*	Spreghini, E., Maida, C. M., Tomassetti, S., <i>et al</i> 2006
Posaconazol	Sensible	Resistente	N/A*	
Anfotericina B	Sensible	Sensible	Sensible	
Caspofungina	Sensible	Sensible	Sensible	
Fluconazol	Sensible	Resistente	Sensible	Lavazzo, C., Gkegkes, I. D., Zarkada, I. M., <i>et al</i> 2011
Ac. bórico Vaginal	N/A*	Sensible	N/A*	

Nota: *NA: No Aplica

ANTECEDENTES

El género *Candida* se conoce por tener más de 150 especies heterogéneas, de las cuales una minoría está implicada en el humano (Silva, S., Negri, M., Henriques, M., *et al.*, 2011). Se ha identificado que la mayoría de las personas presentan una sola cepa de *Candida spp.* en diferentes partes del cuerpo (Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C. *et al.*, 2018) ya que forma parte del sistema gastrointestinal normal, microbiota de cavidad oral, tracto urogenital, respiratorio y piel (Kovachev, S. M., & Vatcheva-Dobrevska, R. S., 2015).

En los últimos años, las pautas de infecciones por *Candida* han cambiado. Anteriormente *C. albicans* era la causa más prevalente de infecciones mientras que en los últimos años, otras especies de *Candida* se han convertido en patógenos comunes que causan patologías (Silva, S., Negri, M., Henriques, M., *et al.*, 2011).

Morfológicamente cada especie de *Candida* presenta una característica distinta, pero la más común es *C. albicans* que presenta unas hifas que se forman a partir de levaduras, las cuales se pueden apreciar en forma de ramificaciones que se alargan en septos. *C. glabrata* es la segunda más frecuente, esta se puede encontrar como blastoconidios, a diferencia de *C. albicans* (Silva, S., Negri, M., Henriques, M., *et al.*, 2011).

Una de las principales enfermedades causadas por *Candida* es Candidiasis Vulvovaginal (CVV), que puede ser recurrente y la *Candida* en algunas ocasiones presenta una resistencia a los agentes antifúngicos, entre ellos los azoles. En el caso de algunas especies no *albicans* se encontró que el ácido bórico es el idóneo para *C. glabrata*; (Lavazzo, M.D., Ioannis D., Gkegkes, M.D. *et al.*, 2007) así como el posaconazol, el fluconazol y la anfotericina para *C. parapsilosis* (Silva, S., Negri, M., Henriques. *et al.*, 2008).

El diagnóstico con mayor sensibilidad y especificidad de laboratorio es el aislamiento de las especies, las cuales se han estudiado en candidemias debido a la mortalidad que ocasionan; sin embargo, hay poca información de antecedentes en zonas genitales, ya que es común aislar *Candida* en esta área anatómica (Taira, C. L., Okay, T. S., Delgado, A. F., *et al.*, 2014) considerando innecesaria la detección de las especies de *Candida*, ver **gráfico 1**.

Algunos estudios reportan que se ha aislado *Candida sp.* en varias secreciones producidas por el cuerpo, como se puede ver en el siguiente **Gráfico 1**.

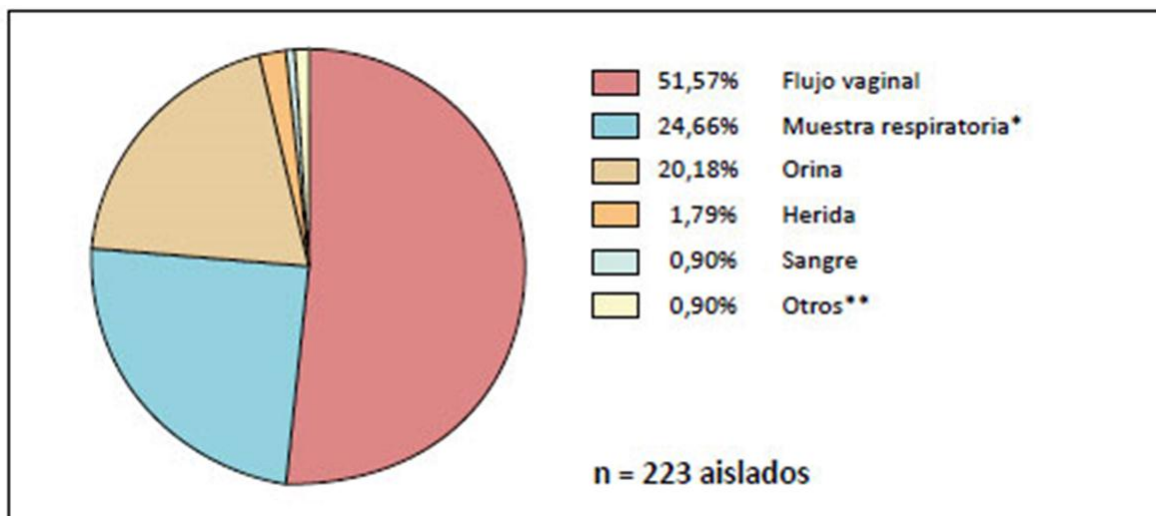


Gráfico 1. Distribución de especies de *Candida* aisladas de acuerdo al tipo de muestras. *Muestras de vías respiratorias, ** Otros: uñas y líquido peritoneal. Tomado de: Alburquenque, C., Beltrán, S., Olivares, R., *et al.*, 2013.

Las especies de *Candida* se estudian comúnmente en áreas donde no deben aislarse y que representan una tasa de mortalidad alta. En un estudio chileno que incluyó 120 pacientes con candidemias diagnosticadas, se detectó a las especies específicas de *Candida* implicadas en estas patologías (Siri, L., Legarraga, P., García, P., *et al.* 2017) tal como se puede observar en el **Gráfico 2**.

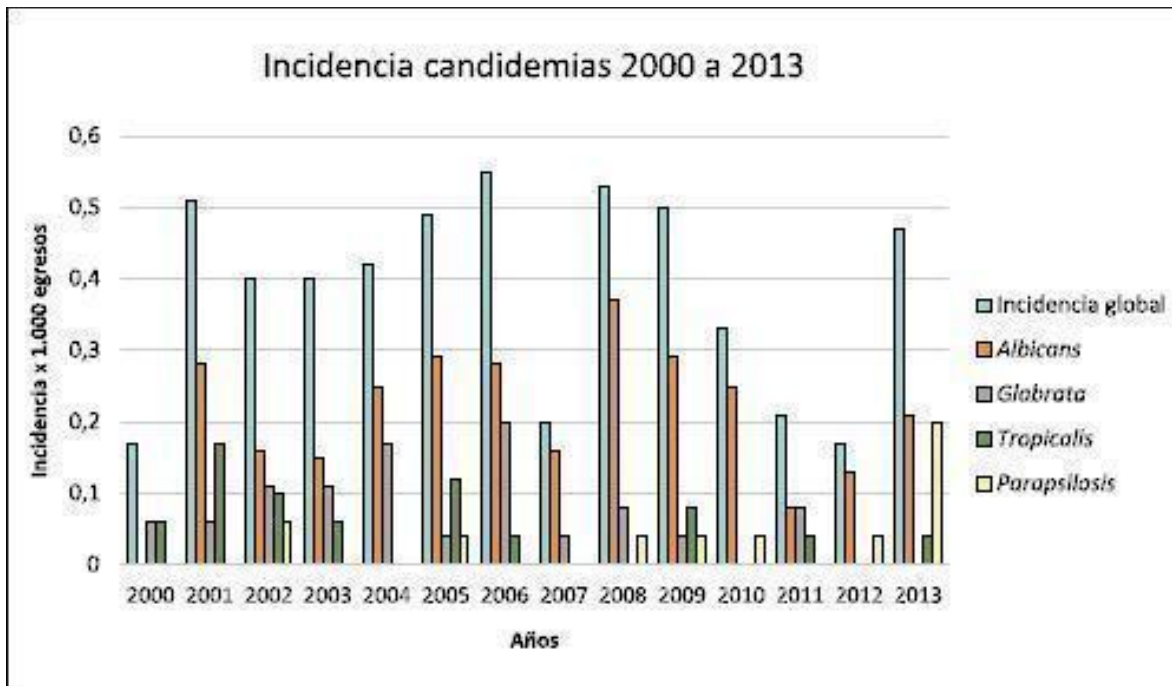


Gráfico 2. Incidencia anual de episodios de candidemias por especie. Tomado de: Siri, L., Legarraga, P., García, P., et al. 2017. Se identificaron 120 pacientes de los cuales presentaban al menos una co-morbilidad, siendo las más frecuentes: enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus y patología hemato-oncológica. Encontrando *C. albicans* fue la especie más frecuentemente seguida de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis*.

En Urmia, Irán, se realizó un estudio que incluyó a 126 pacientes receptores de trasplante renal (RTR), encontrándose que la detección de *Candida* en 41 pacientes está asociada a una tasa de morbilidad y mortalidad altas. Los pacientes trasplantados son altamente susceptibles a las infecciones fúngicas causadas por alguna de las especies de *Candida*, teniendo una alta tasa de resistencia farmacológica antimicótica, convirtiendo a la *Candida* es un desafío clínico, esto debido a la poca experiencia que se cuenta para un correcto manejo. Los datos recopilados en este estudio fueron la edad, sexo, factores de riesgo, la presentación clínica y sitio de toma de muestra micológica; las muestras consistían en orina, biopsia, liquido peritoneal y hemáticas. Las cuales primero son cultivadas por 2 días, posteriormente es amplificada por un PCR. En los resultados

se encontró que la principal especie aislada fue *C. albicans*, y de las especies no albicans principales fueron *C. parapsilosis*, ambas fueron encontradas principalmente en muestras de orina seguido del área peritoneal, encontrando principalmente *C. albicans* y *C. parapsilosis* junto con otras especies, como se describe en la siguiente **tabla 4** (Diba, K., Makhdoomi, K., Nasri, E., et al. 2018).

Tabla 4. Datos Clínicos de 41 RTR con Candidiasis en el Centro de Investigación de Nefrología y Trasplante de Riñón, de 2012-2016.

Presentación clínica de <i>Candida</i> (no.*)	Muestras	Especie <i>Candida</i> (no.)	Resistencia al Fluconazol (no.)
Candidemia (n=4)	Hemático	<i>C. albicans</i> (n=2) <i>C. glabrata</i> (n=1) Otras <i>Candidas</i> (n=1)	<i>C. albicans</i> (n=1)
Candidiasis del tracto urinario (n=17)	Orina	<i>C. albicans</i> (n=6) <i>C. glabrata</i> (n=1) <i>C. parapsilosis</i> (n=2) Otras <i>Candidas</i> (n=8)	<i>C. albicans</i> (n=3)
Candida neumonía (n=3)	Biopsia pulmonar transbronquial	<i>C. albicans</i> (n=2) <i>C. parapsilosis</i> (n=1)	-
Candidiasis Hepatoesplénica (n=3)	Biopsia	<i>C. albicans</i> (n=1) Otras <i>Candidas</i> (n=1)	-
Peritonitis (n=8)	Fluido peritoneal	<i>C. albicans</i> (n=4) Otras <i>Candidas</i> (n=4)	<i>C. albicans</i> (n=1) Otras <i>Candidas</i> (n=1)
Candidiasis intra-abdominal (n=6)	Biopsia	<i>C. albicans</i> (n=3) Otras <i>Candidas</i> (n=4)	<i>C. albicans</i> (n=1)

Nota: no.* Numero de muestras, datos obtenidos de Diba, K., Makhdoomi, K., Nasri, E., et al. 2018

Una de las áreas más comunes para aislar *Candida spp.* es la cavidad oral, que mayormente se ve afectada por las enfermedades sistémicas adquiridas. Esta puede iniciar en vía oral hasta producir infecciones clínicas graves y resistentes a los tratamientos antifúngicos, tal como se ha mencionado; lo cual es adjudicable a las múltiples especies de *Candida* e infecciones bucales concomitantes. En este menester, se han reportado estudios como el de la universidad de Pekín, China durante el período del 2010 al 2013, donde se aislaron 11,161 cepas de *Candida* de 9,769 pacientes con candidiasis oral (CO), encontrando a *C. albicans* como la más común, seguida de *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* en segundo, tercero y cuarto lugar, respectivamente. Durante los 4 años de estudio, *C. glabrata* fue en aumento al igual que las infecciones mixtas con presencia de dos o más especies de *Candida* (Hu, L., He, C., Zhao, C., et al., 2019) como se muestra en la siguiente **tabla 5**.

Tabla 5. Distribución de especies de *Candida* oral. Tomado de: Hu, L., He, C., Zhao, C., et al., 2019.

<i>Candida</i> species	Number of patients (N, %)							
	1st year		2nd year		3rd year		4th year	
Single species isolated								
<i>Candida albicans</i> (CA)	1994	(73.63)	1919	(77.32)	1689	(76.05)	1735	(73.58)
<i>Candida tropicalis</i> (CT)	120	(4.43)	53	(2.14)	55	(2.48)	47	(1.99)
<i>Candida krusei</i> (CK)	31	(1.14)	17	(0.68)	10	(0.45)	8	(0.34)
<i>Candida glabrata</i> (CG)	8	(0.3)	9	(0.36)	12	(0.54)	16	(0.68)
Other <i>Candida spp.</i> (OC)	294	(10.86)	184	(7.41)	171	(7.7)	149	(6.32)
Dual species isolated								
CA + OC	91	(3.36)	146	(5.88)	90	(4.05)	160	(6.79)
CA + CT	75	(2.77)	56	(2.26)	58	(2.61)	56	(2.37)
CA + CK	22	(0.81)	20	(0.81)	28	(1.26)	36	(1.53)
CA + CG	7	(0.26)	10	(0.4)	44	(1.98)	56	(2.37)
CT + OC	20	(0.74)	13	(0.52)	11	(0.5)	22	(0.93)
CT + CK	3	(0.11)	2	(0.08)	3	(0.14)	6	(0.25)
CT + CG	1	(0.04)	0	(0)	0	(0)	3	(0.13)
CK + OC	12	(0.44)	9	(0.36)	13	(0.59)	19	(0.81)
CK + CG	0	(0)	2	(0.08)	0	(0)	1	(0.04)
CG + OC	2	(0.07)	2	(0.08)	2	(0.09)	3	(0.13)
Three or more <i>Candida spp.</i> isolated	28	(1.03)	40	(1.61)	35	(1.58)	41	(1.74)
Total	2708	(100)	2482	(100)	2221	(100)	2358	(100)

En un estudio realizado en diferentes centros hospitalarios de la ciudad de México, sobre infecciones intrahospitalarias de origen fúngico se dio énfasis en estudiar las cepas de *Candida*, debido a su frecuencia de gravedad y letalidad. La evidencia demuestra que son pocos los reportes donde se aísla *Candida spp.* en cualquier tipo de cavidad anatómica o muestras; sin embargo, este estudio demostró que cuatro de las principales especies, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C.*

parapsilosis, fueron aisladas de 81 muestras clínicas de diferentes áreas anatómicas y diferentes fluidos de pacientes hospitalizados, quienes habían sido diagnosticados con neumonía, tuberculosis, o fiebre de origen desconocido, las cuales reportaron como especie más común a *C. albicans*, seguida de *C. tropicalis*. Estos resultados fueron obtenidos mediante cultivo y PCR (Camacho-Cardoso, J. L., Martínez-Rivera, M. Á., Manzano-Gayosso, P., *et al.*, 2017) como se puede ver en la **Gráfico 3**. Uno de los hallazgos más relevantes de este trabajo, es la importancia en la sensibilidad y especificidad que demostró tener la técnica molecular de PCR a diferencia del cultivo; por lo tanto, se evidencía claramente, que para la identificación de especies de este hongo, es necesario utilizar métodos diagnósticos asequibles y validados para ofrecer una herramienta diagnóstica precisa.

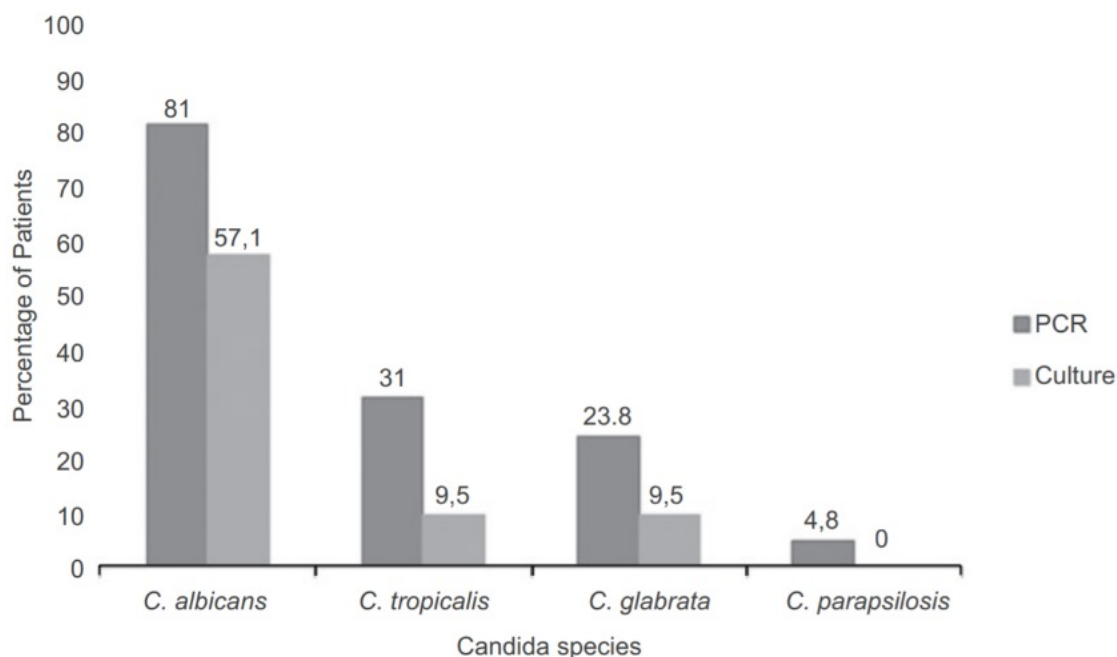


Gráfico 3. Correlación entre PCR y cultivo para la detección de cada una de las especies de Candida. Comparación grafica de los resultados obtenidos de la identificación de especies de *Candida* por cultivo y PCR. Tomado de Camacho-Cardoso, J. L., Martínez-Rivera, M. Á., Manzano-Gayosso, P., *et al.*, 2017

Tal como se ha reportado hasta ahora, aunque es poco común aislar cepas de *Candida*, es común ver que el cultivo es el estándar de oro para buscarla de manera intencionada; no obstante, son pocos los reportes donde se demuestra la detección de especies de este hongo en áreas donde no es común; por ejemplo, en área genitales, sitio que no se considera relevante puesto que se ha demostrado que algunas especies como *Candida albicans* forma parte de la microbiota en mucosas cervicovaginales y uretrales.

Es importante determinar la especie causal de la afección en el paciente, principalmente para proporcionar un tratamiento antifúngico óptimo y sensible, y de esta forma prevenir la resistencia a los antimicrobianos (Lobaina Rodríguez, T., Zhurbenko, R., Rodríguez Martínez, C. *et al.*, 2010). La detección temprana de la especie de *Candida* nos permite ofrecer una respuesta precisa al paciente sobre la enfermedad producida por este patógeno, y prevenir la propagación y la resistencia antimicrobiana (Kouri, A. M., Kieffer, T. W., Nailescu, C., *et al.*, 2020); es decir, hacer que la detección de la especie sea algo de rutina, para evitar las complicaciones y disminuir la mortalidad (Lobaina Rodríguez, T., Zhurbenko, R., Rodríguez Martínez, C. 2010); ya que se puede encontrar que cada especie tiene una adherencia diferente a cada microambiente celular, la cual puede dar como consecuencia las infecciones mixtas; es decir, la implicación de más de una especie de *Candida* y algunos otros patógenos concomitantes, provocando un cuadro infeccioso grave (Osawa, K., Shigemura, K., Yoshida, H., 2013).

En resumen, es indispensable conocer las múltiples resistencias en las candidosis para determinar el tratamiento más adecuado, y para alcanzar este objetivo, las estrategias por biología molecular como la PCR, nos permiten detectar especies específicas con mayor sensibilidad que el cultivo, partiendo de diferentes muestras anatómicas; demostrando que son repetibles; es decir, siempre se obtienen los mismos resultados; robustas, que con cambios mínimos en las características de procesamiento el resultado es el mismo, y específicas, que reconocerán de manera inequívoca para detectar un resultado negativo o positivo.

JUSTIFICACIÓN

Es indispensable validar las herramientas de biología molecular existentes que permitan desarrollar paneles diagnósticos para discernir entre las diversas especies en una sola reacción, que permitirá una atención integral a los pacientes.

Este proyecto ofrece la posibilidad de validar un panel diagnóstico múltiple con parámetros de robustez, especificidad y repetibilidad para la detección simultánea de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* en el tracto urogenital. Es indispensable conocer la especie de *Candida* involucrada, puesto que de esto depende el éxito y la resolución de la enfermedad y además permite disminuir la resistencia a los antimicrobianos en las candidosis urogenitales.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el proceso de validación más adecuado para el desarrollo de un panel de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* en muestras urogenitales?

HIPÓTESIS

La detección simultánea de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* es factible mediante un proceso de validación para un panel que detecte las tres especies de *Candida* de manera simultánea en una sola reacción mediante técnicas de biología molecular.

HIPÓTESIS NULA

La detección simultánea de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* no es factible mediante un proceso de validación para un panel que detecte las 3 especies de *Candida* de manera simultánea en una sola reacción mediante técnicas de biología molecular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Validar un múltiplex diagnóstico para la identificación de *C. albicans*, *C. glabrata*, y *C. parapsilosis* en muestras urogenitales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar una base de datos con muestras positivas a *Candida spp.* derivadas del banco de muestras donadas.
2. Sintetizar controles sintéticos para la identificación de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*.
3. Estandarizar las condiciones de amplificación de los pares de oligonucleótidos sintéticos específicos para la detección individual de cada especie de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*.
4. Validar la robustez, repetibilidad y especificidad del panel múltiplex en una sola reacción.
5. Identificar muestras positivas a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* en muestras urogenitales.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DE ESTUDIO

▪ TIPO Y CLASIFICACION DE ESTUDIO

Clasificación del Estudio:	Epidemiológico
Tipo de diseño:	Prospectivo y Transversal.
Tipo de análisis:	Descriptivo.
Temporalidad:	Diciembre 2020 a Junio 2021.
Tipo de Muestra:	Causal e Incidental.
Población de Estudio:	Pacientes donadores de muestras urogenitales.

▪ DEFINICIÓN DE LAS UNIDADES DE OBSERVACIÓN

Criterios de Inclusión:

1. Muestras urogenitales de pacientes donadores positivos a *Candida spp.* por biología molecular.
2. Muestras de pacientes mayores de 18 años
3. Muestras de pacientes sin distinción de sexo
4. Muestras positivas a *Candida spp.* donadas durante diciembre 2020 a junio 2021

Criterios de Exclusión:

1. Muestras urogenitales de pacientes donadores negativos a *Candida spp.* por Biología Molecular.
2. Muestras de pacientes menores de 18 años

- Muestras positivas a *Candida spp.* donadas fuera del período descrito en el proyecto.

Criterios de Eliminación:

- Que el material genético obtenido de las muestras consentidas presente degradación.
- Que al obtenerse el resultado final se demuestre ausencia del material genético.

▪ DEFINICIÓN DE VARIABLES Y UNIDADES DE MEDIDA

Tabla 6. Variables y Unidades de Medida

VARIABLE	DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
VARIABLE INDEPENDIENTE			
Especies de <i>Candida spp.</i>	Identificación por biología molecular de: <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> ,	Nominal dicotómica	1. Positivo. 2. Negativo.
VARIABLE DEPENDIENTE			
Sexo	Condición orgánica, masculina o femenina.	Nominal dicotómico	1. Hombres. 2. Mujeres.
Patógenos Concomitantes	Patógeno: Que origina o desarrolla una enfermedad. Aplicado a un microorganismo Concomitante: Que aparece o actúa conjuntamente con otra cosa.	Nominal dicotómica	<i>Ureaplasma</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>HSV 1 y 2</i> , <i>Mycoplasma spp.</i> , <i>MCV</i> , <i>Treponema pallidum</i> , <i>Haemophilus spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>VPH</i>

FLUJO DE TRABAJO INTRALABORATORIO

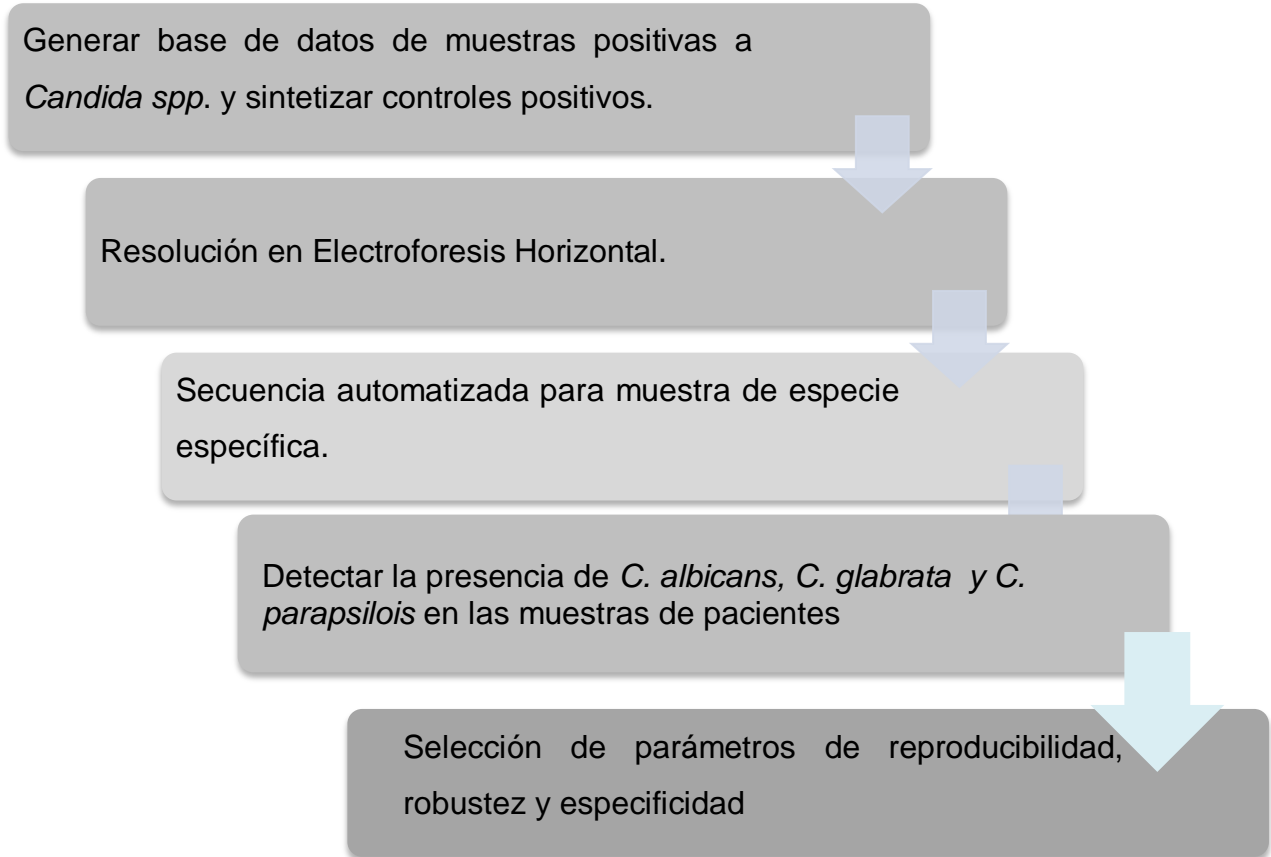
A continuación se describe brevemente el proceso del diseño experimental en el laboratorio.

Inicialmente se generó una base de datos con muestras positivas a *Candida spp.* las cuales fueron donadas por los pacientes. El período de recolección de estas fue del mes de Diciembre del 2020 a Junio del 2021.

Una vez identificadas las muestras, corroboramos que los oligonucleótidos sintéticos de referencia Tomado de Taira, C.L., 2014 detectaban de manera inequívoca las especies *C. albicans*, *C. glabrata*, y *C. parapsilosis*. Este proceso de identificación única y homología del 100%, fue llevado a cabo utilizando el programa nBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Aleksandr 2008; Zhang, 2000). Este paso es clave para demostrar que la secuencia de los oligonucleótidos, son específicos y que no entrecruzan con otras secuencias, aunque sean homólogas.

Posteriormente, la secuencia fue insertada en un plásmido sintético mediante herramientas *in silico*. Una vez diseñados, fueron sintetizados por MacroGen Kr. Estos plásmidos fueron utilizados como control positivo para la estandarización de los parámetros de la PCR y de electroforesis horizontal en geles de agarosa. Además, fueron también utilizados para validar los parámetros de repetibilidad y robustez (**Flujo 1**).

Flujo 1. Flujo de trabajo intralaboratorio



Nota: Proceso de realización de actividades dentro del laboratorio

METODOLOGÍA

Síntesis de controles positivos para la identificación de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*.

▪ SECUENCIAS

Las secuencias utilizadas para la detección de las tres especies de *Candida*, como se muestra en la **Gráfico 4**, fueron analizadas a través de un alineamiento múltiple, a través de la plataforma llamada nBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Aleksandr 2008; Zhang,2000), con el objetivo de demostrar que los oligonucleótidos detecten de manera específica cada uno de los tipos de *Candida*, que posteriormente permitirán sintetizar los plásmidos como controles positivos, como se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Oligonucleótidos sintéticos empleados para la PCR simple y múltiple

Especie	GENBAN K	SECUENCIAS	NOMBRE DEL OLIGONUCLEÓTIDO	TAMAÑO DEL AMPLICÓN
<i>C. albicans</i>	KU095860 .1	TTTATCAACTTGTCACACCAGA	CALB ½ F	271 bp
		ATCCCGCCTTACCACTACCG	CALB ½ R	
<i>C. glabrata</i>	AM49279 8.1	TTATCACACGACTCGACACT	CGL ½ F	423 bp
		CCCACATACTGATATGGCCTACAA	CGL ½ R	
<i>C. parapsilosis</i>	AJ635316 .1	GCCAGAGATTAACCTCAACCAA	CPAR 3/2 F	297 bp
		CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC	CPAR 3/2 R	

Oligonucleótidos específicos descritos para *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* diseñados con Primer-BLAST **Tomado de:** Taira, C.L., 2014. A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples

● SÍNTESIS DE PLÁSMIDOS COMO CONTROLES POSITIVOS

Una vez que se demostró que las secuencias de oligonucleótidos detectan de manera específica cada especie de *Candida spp*, se sintetizaron *in silico* los

plásmidos o vectores utilizados para la síntesis de los controles positivos. Estos controles sintéticos se diseñaron debido a la facilidad de mantener estables las secuencias positivas y por su costo económico a diferencia de la compra de las cepas o gDNA de cada especie de *Candida*. Para insertar la secuencia específica de cada especie, utilizamos el vector pGM-Amp de 2710 bp, tal como se muestra en el **Gráfico 4**. Una vez diseñado *in silico*, este se envió a los laboratorios Macrogen (Seoul, Korea) para la síntesis automatizada de los controles positivos.

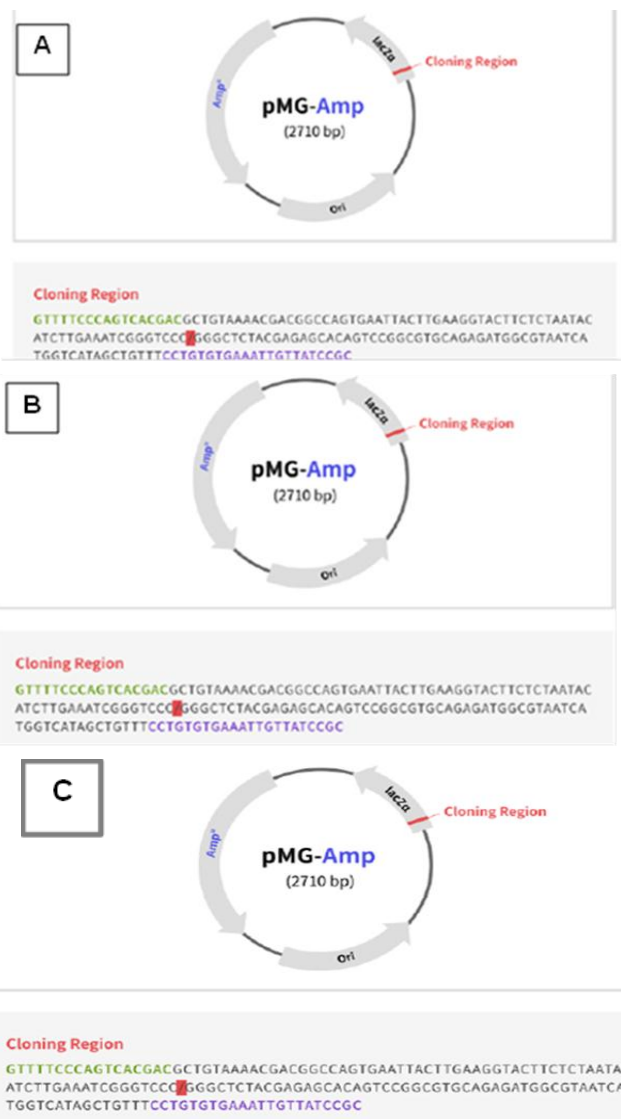


Gráfico 4. Diseño de plásmidos *In silico*. A: *C. albicans* CAIb-KU095860.1; B: *C. glabrata* CGIa-AM492798; C: *C. parapsilosis* CPara-AJ635316.1. Plásmidos *In silico* diseñados por nuestro equipo de trabajo y sintetizados automáticamente por Macrogene, Kr.

- **ESTANDARIZACIÓN DE PCR INDIVIDUAL O POR ESPECIE**

Una vez que los controles positivos fueron recibidos en el laboratorio, se sometieron a la técnica de PCR, la cual permitió detectar que las secuencias sintetizadas en los plásmidos o vectores son correctos.

El proceso de PCR utilizando cada plásmido o control positivo, constó de la separación de la muestra, la cual fue colocada en un microtubo de 200 ul, al cual se le agregaron una mezcla maestra constituida por una unidad de Taq polimerasa, dNTP's, MgCl₂ y solución Q (Qiagen, USA), se utilizó aprox. 20 ng de gDNA. Debido a que los oligonucleótidos presentaron varias temperaturas teóricas de alineamiento, se utilizó para la estandarización inicial un gradiente de temperatura, como se pueden ver en la **tabla 8** las temperaturas utilizadas, las cuales consisten en temperaturas únicas en cada carril de pozos; es decir, cada fila de muestras y pozos tiene una misma temperatura y permite analizar en una misma corrida, distintas condiciones de alineamiento.

Tabla 8. Temperaturas para PCR.

Carriles	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
Temperatura	53°C	54°C	55°C	56°C	57°C	58°C

Nota: temperaturas utilizadas en el termociclador por carril para realización de PCR.

Posteriormente, se colocaron en el termociclador, donde la temperatura de desnaturalización fue de 95 °C durante 1 minuto, seguido del alineamiento en forma de gradiente como se ha mencionado anteriormente, y finalmente con una ronda de 72 °C para la elongación del material genético; estos últimos 3 pasos se

llevaron a cabo durante 35 ciclos consecutivos. Una vez terminado el programa de PCR, los pares de bases fueron visualizados en un gel de agarosa al 2.5% con el objetivo de que los amplicones obtenidos pudieran separarse adecuadamente, puesto que en el caso de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* los amplicones son muy similares en tamaño. Para corroborar que el amplicón correspondía al tamaño esperado, en el gel se utilizó una escalera de 100 pares de bases (pb).

- **ESTANDARIZACIÓN DE PCR MÚLTIPLE**

Una vez que se demostró la detección específica individual de las secuencias control utilizando los plásmidos positivos, se procedió mezclar en un solo tubo los tres plásmidos como controles de referencia, con el objetivo de detectar la temperatura más adecuada y la detección inespecífico de cada especie de *Candida*. Utilizamos el programa de PCR con las siguientes características: 95 °C durante 1 minuto, seguido del alineamiento a 56 °C y finalmente con una ronda de 72 °C para la elongación del material genético; estos últimos 3 pasos se llevaron a cabo durante 35 ciclos consecutivos. Una vez terminado el programa de PCR, los pares de bases fueron visualizados en un gel de agarosa al 3%.

- **PARÁMETROS DE VALIDACIÓN**

El procedimiento técnico para evaluar la detección de las especies *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* en muestras urogenitales, colocados en medio de transporte universal, mediante la purificación de gDNA con proteinasa K en conjunto con los oligonucleótidos utilizados en este protocolo de laboratorio, empleando el termociclador de específico para PCR en punto final.

Como primer paso de la validación se realizó una evaluación inicial que contempla la estandarización de las temperaturas específicas de los oligonucleótidos, tanto en pares para detectar cada especie de manera individual, como en multiplex,

donde mediante una sola reacción, fue posible hacer la búsqueda de cada especie. Esto fue descrito en apartados anteriores, en la sección de secuencias.

Los parámetros analíticos utilizados en este protocolo de validación para la detección múltiple de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* fueron:

- Especificidad: capacidad de evaluar en forma inequívoca al analito.
- Robustez: la capacidad del procedimiento para permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones.
- Repetibilidad: El demostrar que con las muestras de los pacientes donadores es posible demostrar que el resultado es repetible en las manos del mismo operador en un período de tiempo corto entre cada repetición y otra.

ESPECIFICIDAD

El parámetro de especificidad permite conocer que el método es el adecuado y detecta de manera inequívoca el analito deseado. Para este procedimiento, además de cerciorarnos de la detección inequívoca de las especies mediante la plataforma nBLAST, se analizó el gDNA de la cepa control *C. albicans*, amablemente donado por el Laboratorio estatal de Michoacán. Para la corrida de PCR, se utilizó el termociclador Veritti (Byosystems).

ROBUSTEZ

Para evaluar este parámetro, uno de cambios aplicados intencionalmente, fue la utilización de varias temperaturas de alineamiento, con el objetivo de analizar que la detección de la secuencia blanco fue posible a pesar de que la temperatura cambió 1°C, lo cual demuestra que estos cambios aunque significativos, como son los grados de temperatura mayor, permiten detectar la secuencia blanco

específica de manera clara y concreta. Cabe destacar que ningún otro parámetro se modificó.

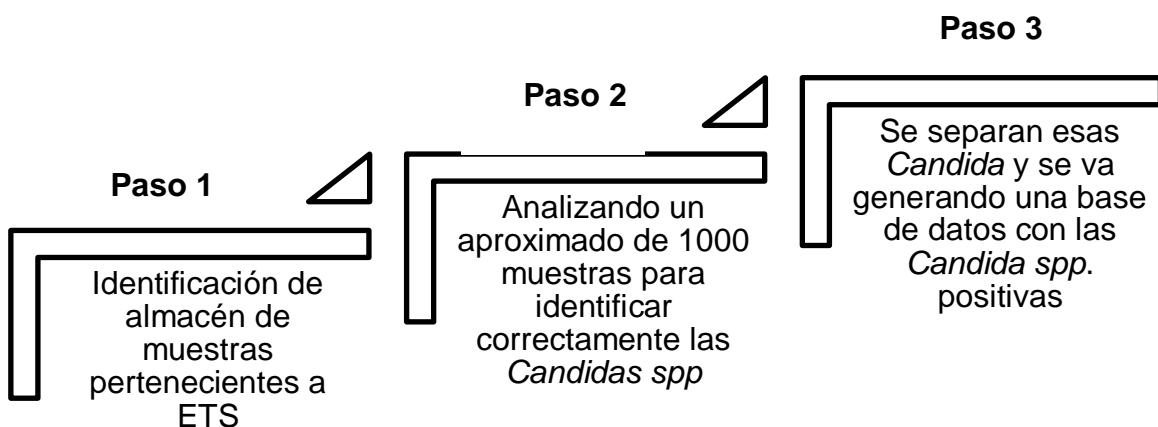
REPETIBILIDAD

Para la evaluación de este parámetro, se evaluaron muestras positivas, las cuales fueron duplicadas en la misma corrida por el mismo técnico que para fines de este proyecto, fue ejecutado por el MPSS.

- **IDENTIFICAR MUESTRAS POSITIVAS A *Candida spp.***

Para la identificación de muestras positivas a *Candida spp.*, en el del laboratorio Central ADN SA de CV que cuenta con un área específica y un almacén de muestras y derivados que identificadas como positivas a *Candida spp.* Se inició generando una base de datos, con las muestras localizadas de *Candida spp.* y se seleccionaron 62 muestras. El proceso completo se muestra en la siguiente **Flujo 2**.

Flujo 2. Flujo de identificación de muestras positivas



Nota: Paso 1; identificar muestras de ETS; 2; identificación de *Candida spp.* positivas; 3; separación de *Candida spp.*

- **GENERAR UNA BASE DE DATOS CON MUESTRAS POSITIVAS A *Candida spp.***

Se genera una base de datos de *Candida spp.* con el total de muestras localizadas de *Candida spp.*, se seleccionaron 62 muestras; para considerarse parte de la base de datos, se debía cumplir con los rubros de si contábamos con muestra o no, si es positiva y a qué especie específica es positivo, sexo del paciente y el patógeno concomitante con el que podría encontrarse. Como se muestra en la siguiente **tabla 9** representativa de la base de datos.

Tabla 9. Tabla Ilustrativa de la base de datos de *Candida spp.*

Sexo	<i>Candida spp.</i>			Patógenos concomitantes (Positivo 1; Negativo 2)												Área anatómica
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Ureaplasma</i>	<i>T. vaginalis</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>C. tracomatis</i>	HSV 1 y 2	<i>Mycoplasma spp.</i>	MCV	<i>Treponema pallidum</i>	<i>Haemophilus spp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	VPH	
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Uretra
M	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	Uretra
M	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	Uretra
F	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	Cérvix
M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	Uretra

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los procedimientos para la obtención de la muestra se apegan a las normas éticas de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y a la Declaración de Helsinki, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos Capítulo I, Disposiciones Comunes, Artículo 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Esta investigación se considera como riesgo mínimo de acuerdo con el artículo 17, Capítulo I, sección II, de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y en cumplimiento con los aspectos mencionados en el Artículo 21. De igual manera se protegerá la confidencialidad de los registros que pudieran identificar a los sujetos del ensayo, respetando la privacidad, integridad y las normas de confidencialidad. Este protocolo representa el extracto del proyecto de investigación perteneciente a la línea de investigación Enfermedades Infecciosas en laboratorios Central ADN S.A. de C.V. Todas las muestras colectadas, fueron obtenidas mediante la carta de consentimiento informado (Anexo A). Esta investigación se considera como riesgo mínimo de acuerdo con el artículo 17. Capítulo I, sección II de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y en cumplimiento con los aspectos mencionados en el Artículo.

La manipulación de las muestras fue llevada a cabo con base en las buenas prácticas de laboratorio descritas en el Sistema de Gestión de Calidad del laboratorio CENTRAL ADN S.A. de C.V. y desechadas de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana Nom-087-Ecol-Ssa1-2002, Protección Ambiental - Salud Ambiental - Residuos Peligrosos Biológico infecciosos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el programa IBM SPSS Versión 25 para Windows. La distribución de las variables cualitativas categóricas y dicotómicas se describió mediante frecuencias y porcentajes. Las variables cuantitativas continuas se describieron como medias \pm desviación estándar bajo el supuesto de distribución normal y homogeneidad de varianzas. Los datos de las variables cualitativas se registraron y analizaron en tablas de contingencia. Los datos discretos se compararon en un análisis univariado mediante la prueba Chi- Square (X^2) y la prueba exacta de Fisher. El nivel de significancia se estableció con un valor de P 0.05.

RESULTADOS

RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN

- **ESTANDARIZACIÓN DE PCR INDIVIDUAL O POR ESPECIE Y DUPLICADO**

Una vez que los plásmidos sintéticos se obtuvieron, fueron utilizados como control positivo. Primeramente, se determinó la temperatura de cada oligonucleótido por separado para la detección de cada una de las especies de *Candida*, como se muestra en las siguientes imágenes **2, 3, y 4**.

Se llevó a cabo la búsqueda intencionada de *C. albicans*; para ello, se utilizó la PCR con una temperatura de alineamiento de 54°C, todas las muestras se llevaron a cabo por duplicado. Los amplicones del tamaño esperado, 272 bp, fueron visualizado en un gel de agarosa al 2% con una tinción de Red Safe, se utilizó el plásmido que contiene la secuencia positiva a *C. albicans*. Ver la **Imagen 2**.

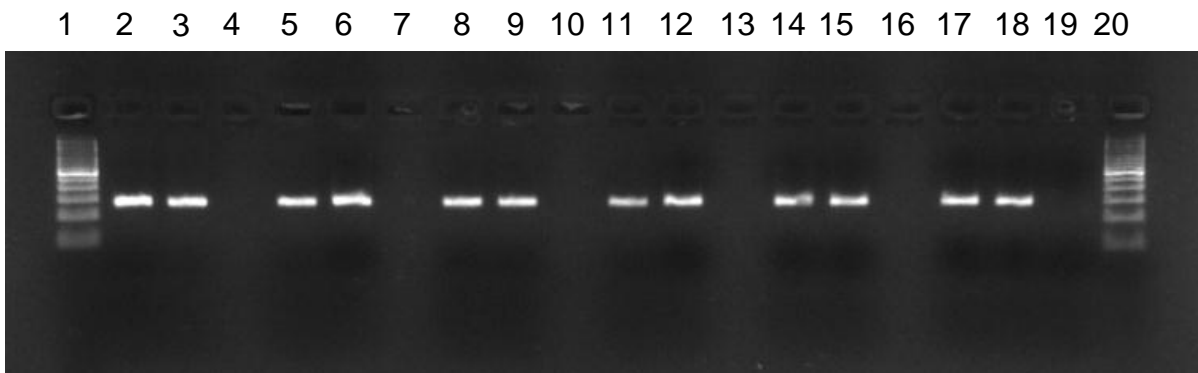


Imagen 2. Estandarización temperatura *C. albicans*. Gel de agarosa al 2% teñido con Red Safe. Carril 1 y 20; marcador de peso molecular; carril 2,3,5,6,8,9,11,12,14,15,17,18 a temperatura de 54°C.

Se llevó a cabo la búsqueda intencionada de *C. parapsilosis*; para ello, se utilizó la PCR con una temperatura de alineamiento de 54°C, todas las muestras fueron por duplicado. Los amplicones del tamaño esperado, 297 bp, fueron visualizado en un gel de agarosa al 2% con una tinción de Red Safe, se utilizó el plásmido que contiene la secuencia positiva a *C. parapsilosis*. Ver la **Imagen 3**.

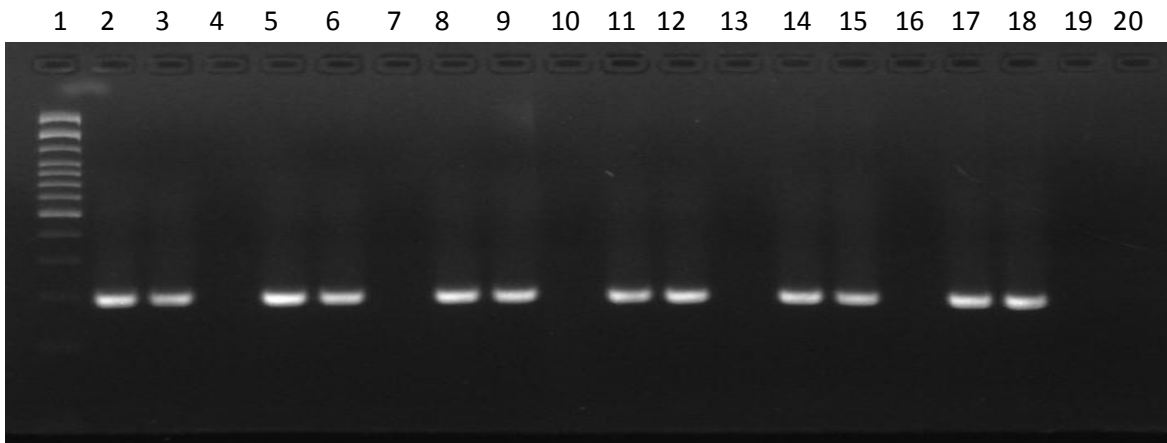


Imagen 3. Estandarización temperatura de *C. parapsilosis*. Gel de agarosa al 2% teñido con Red Safe. Se detecta un amplicon de Carril 1; marcador de peso molecular. Carril 2,3,5,6,8,9,11,12,14,15,17 y 18 a temperatura de 56°C

Se llevó a cabo la búsqueda intencionada de *C. glabrata*; para ello, se utilizó la PCR con una temperatura de alineamiento de 54°C, todas las muestras fueron por duplicado. Los amplicones del tamaño esperado, 423 bp, fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% con una tinción de Red Safe, se utilizó el plásmido que contiene la secuencia positiva a *C. glabrata*. Ver **Imagen 4**

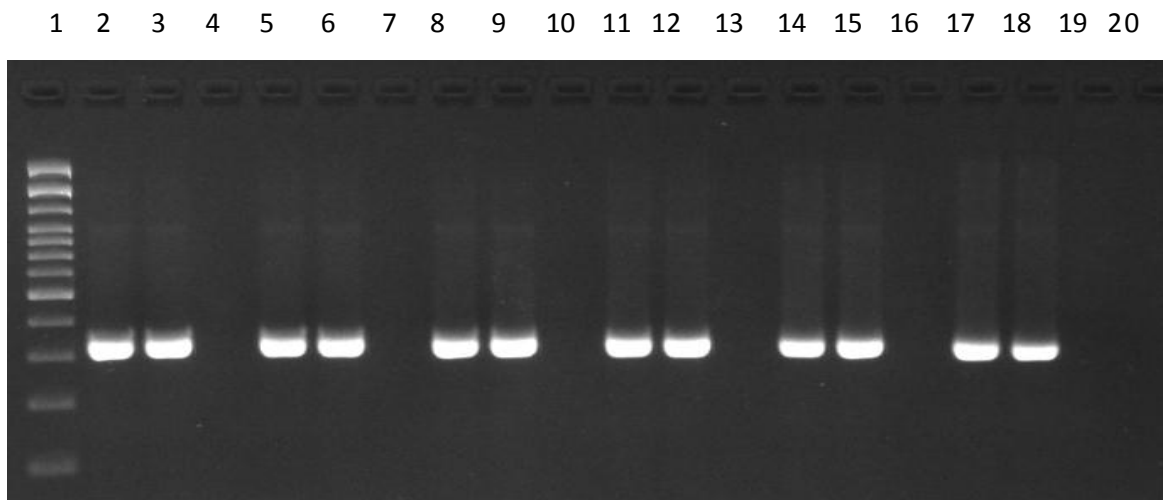


Imagen 4. Estandarización temperatura de *C. glabrata* Gel de agarosa al 2% teñido con Red Safe. Carril 1; marcador de peso molecular. Carril 2,3,5,6,8,9,11,12,14,15,17 y 18 a temperatura de 55°C

- **PARÁMETROS DE VALIDACIÓN**

ESPECIFICIDAD:

Para este procedimiento, además de comprobar la detección inequívoca de las especies mediante la plataforma nBLAST, se analizó el gDNA de la cepa control *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* para verificar que no se empalmara con algún otro patógeno. Ver Tabla 10. Como se puede observar, el porcentaje de identidad entre las secuencias analizadas y los oligonucleótidos utilizados para la detección, se demostró que la identificación es específica y que no hay entrecruzamiento en el reconocimiento con otras especies.

Tabla 10. Oligonucleótidos sintéticos empleados para la PCR simple y múltiple

Especie	GENBAN	SECUENCIAS	NOMBRE DEL OLIGONUCLEÓTIDO	TAMAÑO DEL AMPLICÓN	IDENTIDAD CON LA ESPECIE BLANCO
<i>C. albicans</i>	KU0958 60.1	TTTATCAACTTGTACACCA GA	CALB ½ F	271 bp	100%
		ATCCCGCCTTACCACTACCG	CALB ½ R		
<i>C. glabrata</i>	AM492 798.1	TTATCACACGACTCGACT	CGL ½ F	423 bp	100%
		CCCACATACTGATATGGCCT ACAA	CGL ½ R		
<i>C. parapsilosis</i>	AJ6353 16.1	GCCAGAGATTAAACTCAACC AA	CPAR 3/2 F	297 bp	100%
		CCTATCCATTAGTTTATACTC CGC	CPAR 3/2 R		

Oligonucleótidos específicos descritos para *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* diseñados con Primer-BLAST **Tomado de:** Tomado de Taira, C.L., 2014. A multiplex nested PCR for the detection and identification of Candida species in blood samples

ROBUSTEZ

Para evaluar este parámetro se utilizaron varias temperaturas de alineamiento, con el objetivo de analizar que la detección de la secuencia blanco fue posible a pesar de que la temperatura cambió 1°C lo cual, demuestra que estos cambios, aunque significativos, como son los grados de temperatura mayor, permiten detectar la secuencia blanco específica de manera clara y concreta. Como se muestra en el siguiente gel (**Imagen 5**).

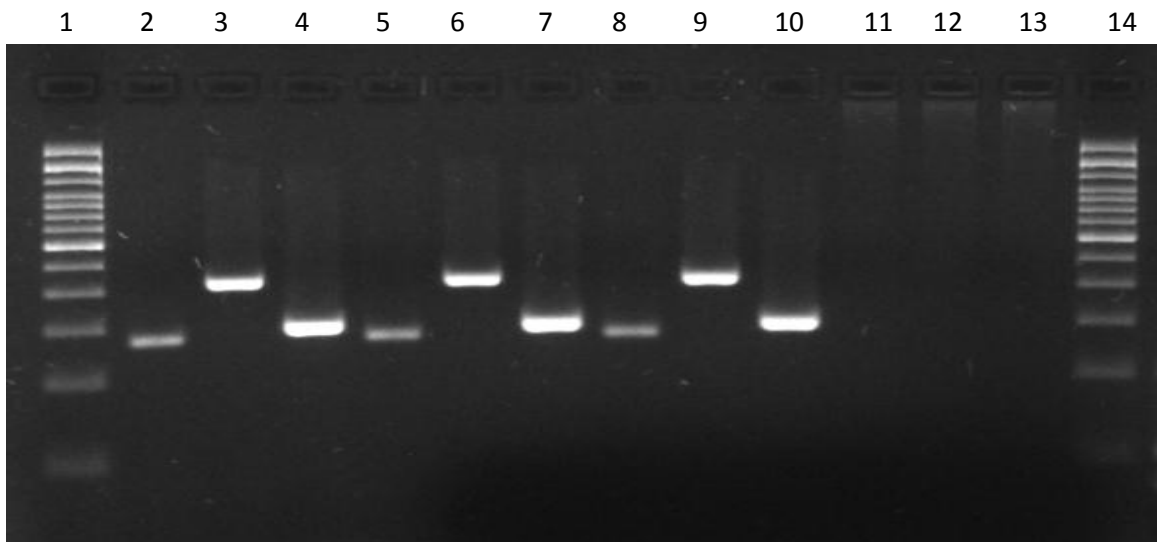


Imagen 5. Robustez utilizando cambios en la temperatura en 54°C, 55°C y 56.5°C Gel de agarosa al 2.5% teñido con Red Safe. Carril 1; marcador de peso molecular. Carril 2-10 se puede observar que los amplicones amplifican adecuadamente con las tres temperaturas.

- **PCR MULTIPLEX**

Se utilizaron 10 pg/ μ l de plásmido en la reacción, se mezclaron los tres plásmidos de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* se utilizó la temperatura de 55°C, 56°C y 57°C. Todos los experimentos se hicieron por duplicado. El resultado demuestra que, en efecto, con diferentes temperaturas de alineamiento, es posible detectar las tres secuencias, 272, 297 y 423 bp; correspondientes a cada especie, como se muestra en el siguiente gel (**Imagen 6**).

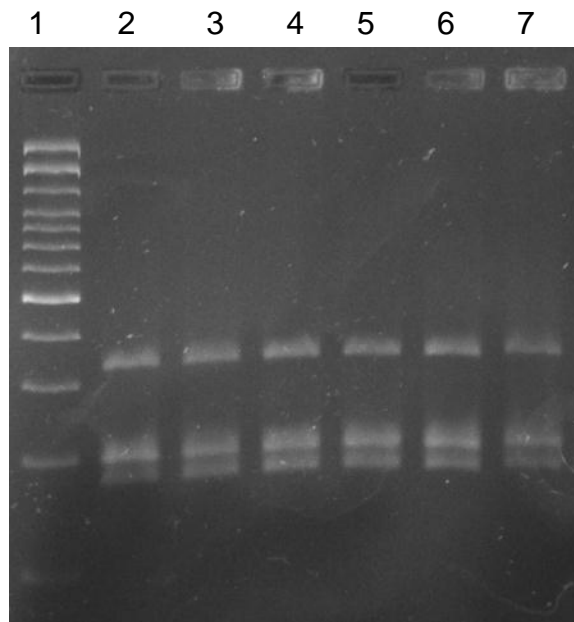


Imagen 6. PCR MULTIPLEX. Gel de agarosa al 2.5% teñido con Red Safe. Carril 1; marcador de peso molecular. se corre el gel posterior a realizar PCR con diferentes temperaturas, con los 3 controles positivos, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*. Y duplicado 1: 55°C, 2: 56°C, 3: 57°C

REPETIBILIDAD

Se evaluaron muestras positivas, las cuales fueron duplicadas en el mismo gel por el mismo técnico, usando nuevamente los tres plásmidos (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*), con las temperaturas iniciales que fueron 54°C, 55°C y 56°C. A pesar de que los amplicones de *C. albicans* y *C. parapsilosis* estaban muy cercanas, fue posible visualizar la separación de cada secuencia, tal como se muestra en la **Imagen 7**.

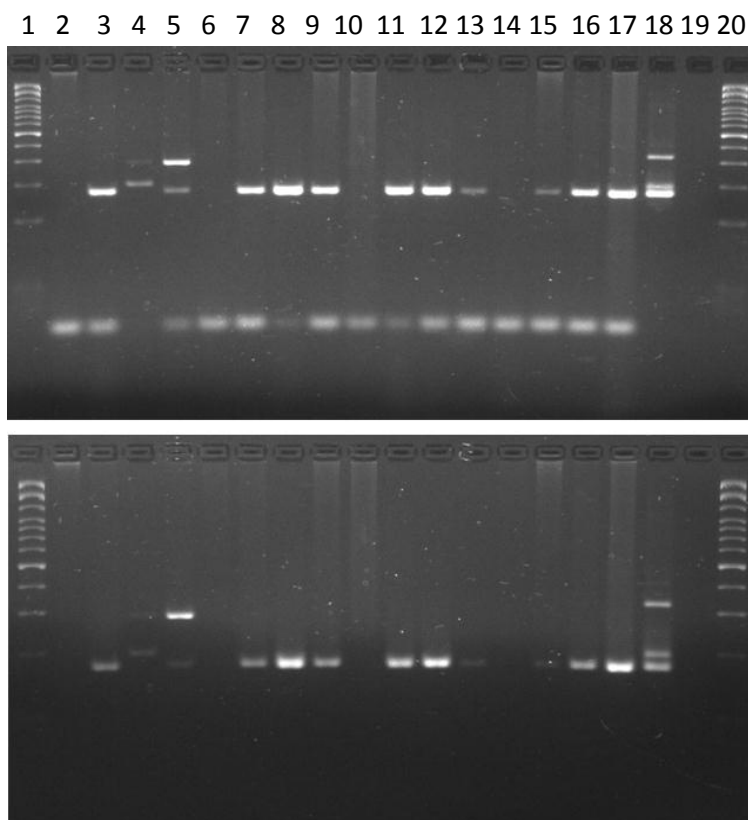


Imagen 7. Repetibilidad. Gel de agarosa al 3% teñido con Red Safe. Carril 1; marcador de peso molecular., Carril 3: con detección de *C. parapsilosis* (297bp), Carril 4, *C. glabrata* (297 bp); 2,6,7,8,10, 11, 12, 14,15,16: *C. albicans* (272 bp). Todas las muestras se encuentran duplicadas.

GENERAR UNA BASE DE DATOS CON MUESTRAS POSITIVAS A *Candida* spp. DERIVADAS DE MUESTRAS DONADAS.

- **BASE DE DATOS.**

Se generó una base de datos, buscando las muestras de *Candida spp.* en el sistema del laboratorio Central ADN SA de CV; con el total de muestras localizadas de *Candida spp.*, se selecciona 62 muestras. En la siguiente **Tabla 11** se muestran las diferentes muestras encontradas.

Tabla 11. Base de datos con muestras positivas a *Candida spp*

Sexo	<i>Candida spp.</i>			Patógenos concomitantes											Área anatómica	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Ureaplasma</i>	<i>T. vaginalis</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>C. tracomatis</i>	HSV 1 y 2	<i>Mycoplasma spp.</i>	MCV	<i>Trponema pallidum</i>	<i>Haemophilus spp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Klebsiella spp.</i>		VPH
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Uretra
M	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	Uretra
M	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	Uretra
F	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	Cérvix
M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	Uretra
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Uretra
M	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	Uretra
F	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cérvix
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cervix
M	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	Uretra
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	Uretra
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Uretra
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Uretra
F	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	Cervix
M	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	Uretra
M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Uretra
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Uretra
M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Uretra
M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	Uretra
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cervix
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Uretra
M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	Uretra
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Vagina
M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	Uretra
M	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	Uretra
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cervix
F	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cervix
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cervix
M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	Uretra
M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	Uretra
F	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cervix
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Uretra
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cervix

M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Uretra
F	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cervix
M	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	Uretra
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Pene
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Uretra
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Uretra
F	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Cervix
M	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	Pene
M	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Pene
M	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	Uretra
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Uretra
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cervix
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Cervix
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Cervix
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Cervix
M	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Pene
M	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Pene
M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Uretra
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Cervix
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Pene
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Pene
F	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Cervix
M	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Pene
F	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cervix
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Verruga
F	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Cervix
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	Cervix
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cervix
F	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Cervix

Nota: M* Masculino; F* Femenino. 1. Positivo, 2. Negativo

- **CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN**

Para el análisis de la edad, se incluyeron 62 casos de pacientes con edad media de 35.5 ± 6.6 años, con un mínimo de 19 años y un máximo de 49 años. La edad media de mujeres fue de 32.0 ± 5.5 años y de hombres fue de 36.8 ± 1.9 años **(Gráfico 5)**.

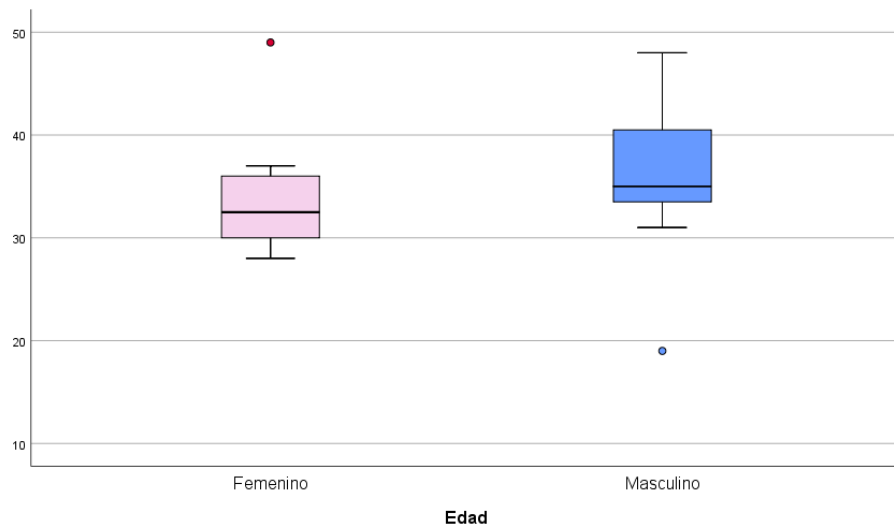


Gráfico 5. Distribución de la edad según el sexo del paciente.

En cuanto al sexo de los pacientes, 40.3% (n=25) fueron del sexo femenino y 59.7% (n=37) fueron del sexo masculino **(Gráfico 6)**.

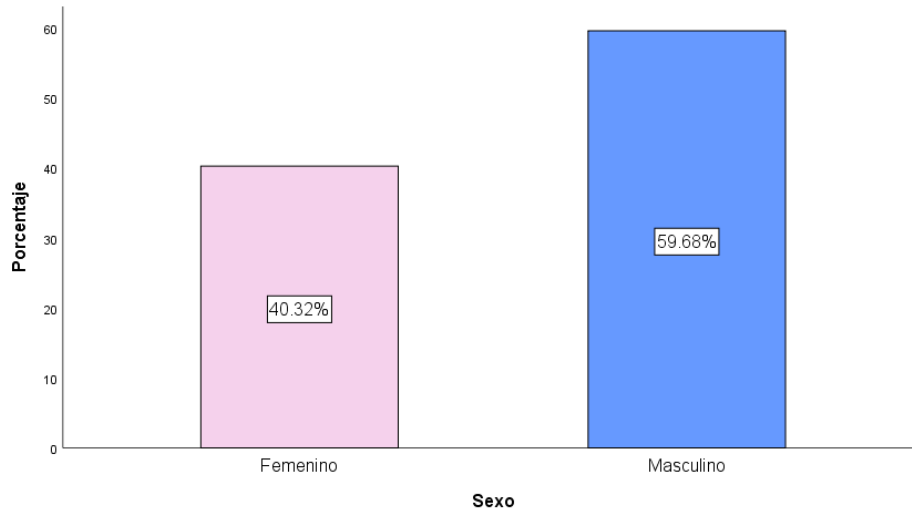


Gráfico 6. Frecuencia del sexo de la población de estudio

En la **gráfica 7** se muestra la frecuencia de los sitios anatómicos de la obtención de la muestra para la detección molecular de patógenos. Encontramos que el sitio más común de obtención de la muestra en mujeres fue el cérvix (37.1%) y en hombres la uretra (46.8%) y pene (12.9%)

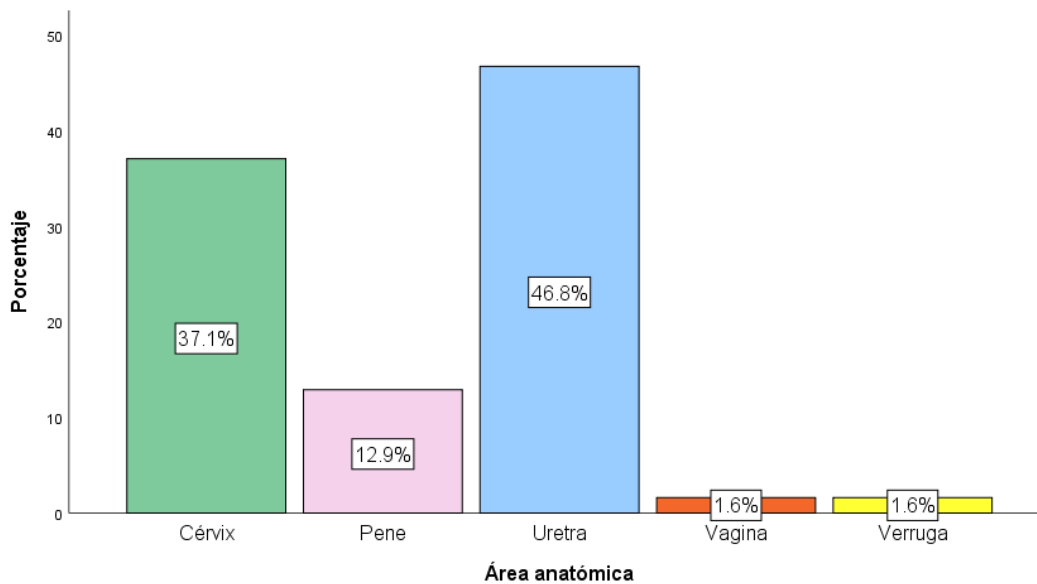


Gráfico 7. Frecuencia de las áreas anatómicas de las que se obtuvo la muestra.

▪ DETECCIÓN DE ESPECIES DE *Candida*

En la población de estudio, se detectaron 41 casos positivos a *Candida* (66.1%) de los cuales 37 casos (59.7%) fueron *Candida albicans*, 4 casos (6.5%) *Candida parapsilosis* (6.5%) y 2 casos (3.2%) *Candida glabrata*, se muestra a selección de las muestras en el siguiente **Gráfico 8** y se muestran los resultados en la población de estudio de los datos obtenidos de las especies de *Candida* estudiadas en los siguientes **Gráficos 9-11**.

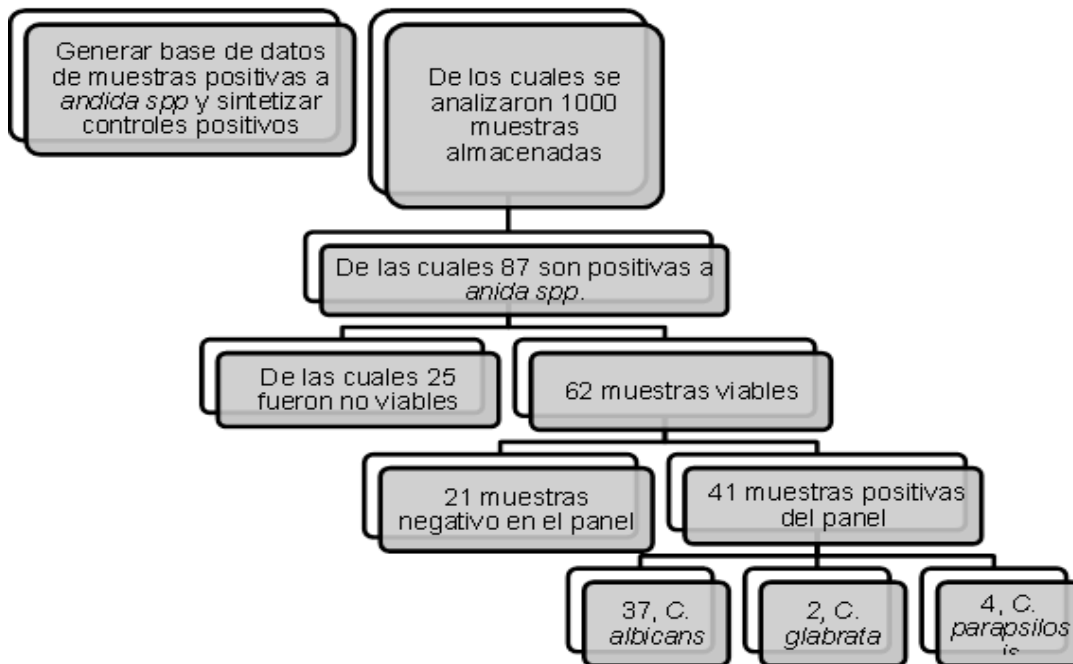


Gráfico 8. Proceso de selección de las muestras e identificación de las muestras positivas a alguna especie de *Candida*.

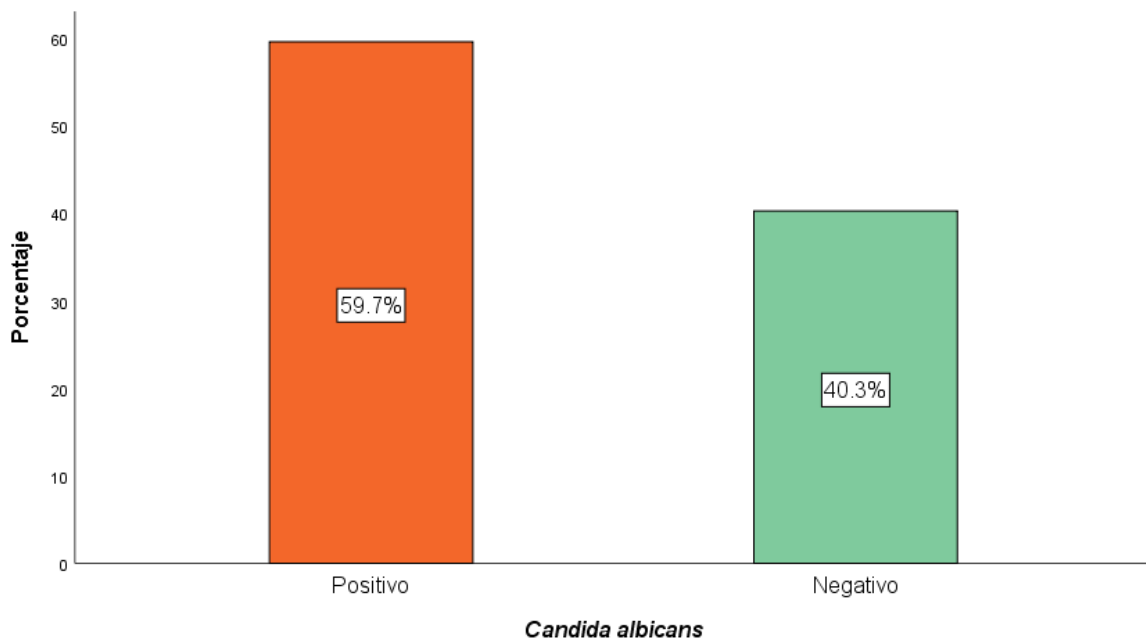


Gráfico 9. Frecuencia *Candida albicans* en la población de estudio.

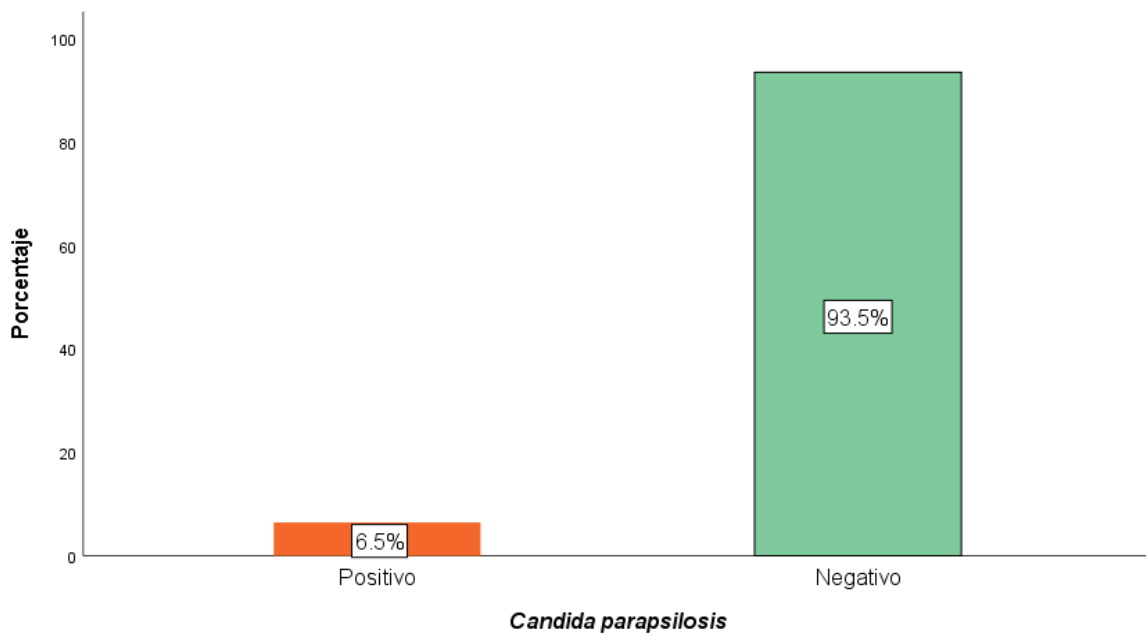


Gráfico 10. Frecuencia *Candida parapsilosis* en la población de estudio.

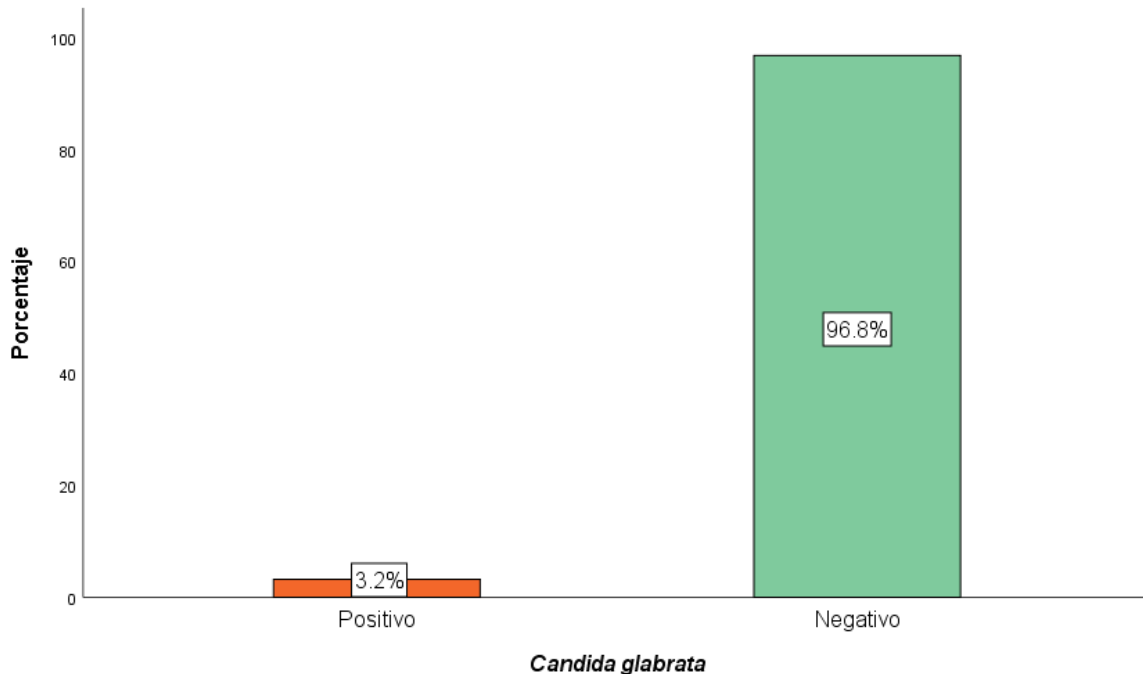


Gráfico 11. Frecuencia *Candida glabrata* en la población de estudio

Se estudia la distribución de frecuencias de las especies de *Candida* detectadas con relación al sexo del paciente, los resultados se muestran en la **tabla 12**. Todas las especies de *Candida* fueron más frecuentes en el sexo masculino, con 25 casos, que en el femenino, con 18 casos.

Tabla 12. Frecuencia de especies de *Candida* en la población de estudio (n=62)

Microorganismo	Femenino		Masculino		Total		Valor de p
	n	%	n	%	n	%	
<i>Candida albicas</i>	17	27.4	20	32.3	37	59.7	0.272 (NS)
<i>Candida glabrata</i>	0	0.0	2	3.2	2	3.2	0.237 (NS)
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1.6	3	4.8	4	6.5	0.518 (NS)

Nota: Abreviaturas: NS, No significativo.
La prueba χ^2 se usó para comparar entre los grupos.
Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

No se encontraron diferencias significativas al comparar la frecuencia del patógeno con el sexo del paciente ($p>0.05$) (Tabla 12; Gráficos 12-14).

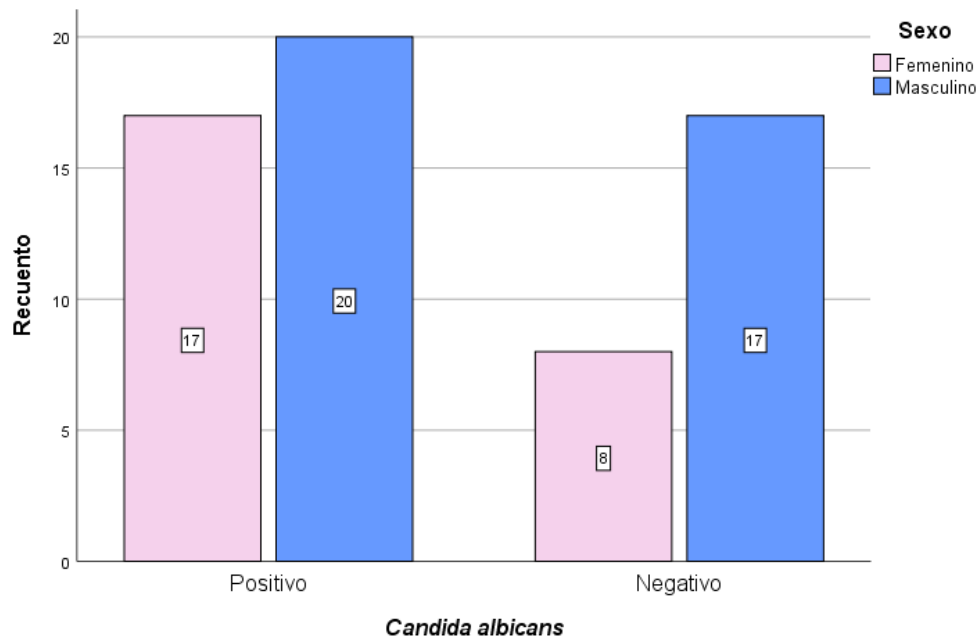


Gráfico 12. Frecuencia Candida albicans según el sexo del paciente.

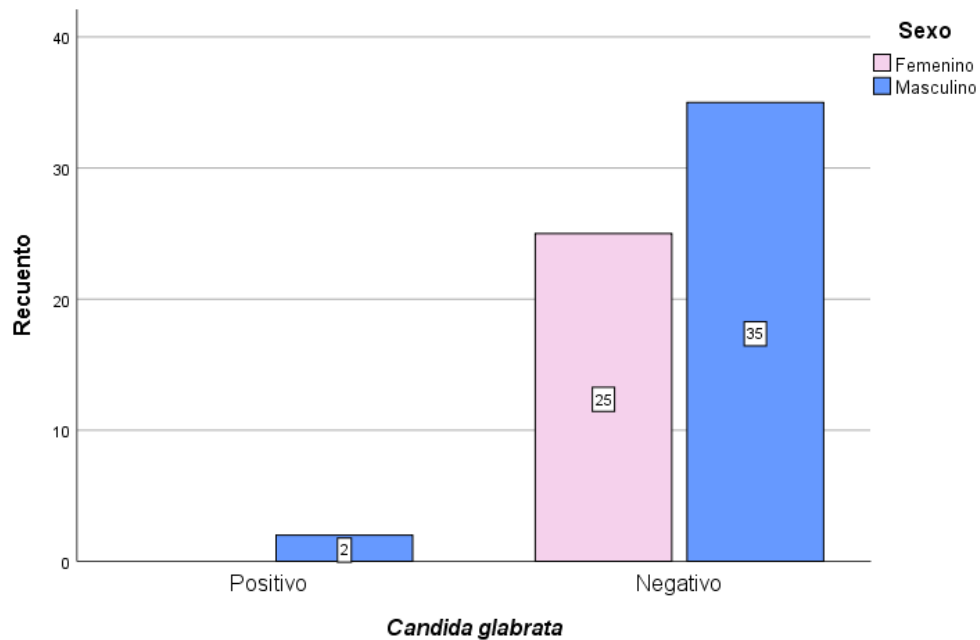


Gráfico 13. Frecuencia Candida glabrata según el sexo del paciente.

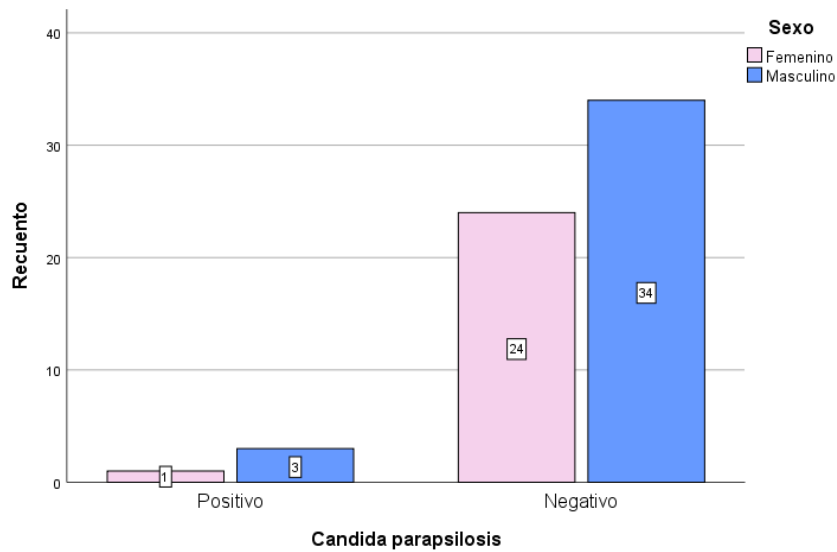


Gráfico 14. Frecuencia *Candida parapsilosis* según el sexo del paciente.

▪ **FRECUENCIA DE PATÓGENOS EN COINFECCIÓN CON ESPECIES DE *Candida***

Los casos positivos a *Candida spp.* presentaron el 64.5 % de coinfección con alguno de los patógenos detectados en el panel genético como se ve en el **Gráfico 15.**

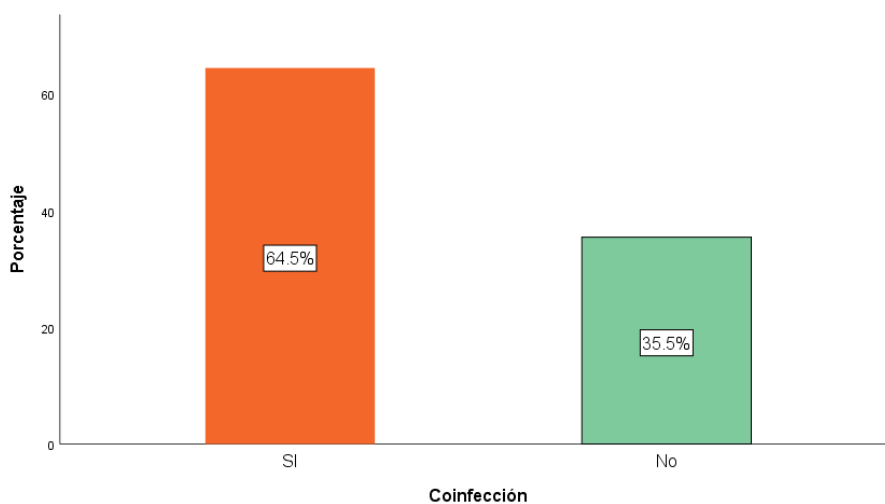


Gráfico 15. Frecuencia casos positivos a *Candida* y con coinfección con algún patógeno incluido en nuestro estudio.

La frecuencia de los patógenos en coinfección *con Candida* se muestra en la **Tabla 13**. Las coinfecciones más frecuentes fueron: VPH 37.1% (n=23), *Haemophilus spp.* 12 (19.4%), *Ureaplasma spp.* 12.9% (n=8) y *Chlamydia trachomatis* 6.6% (n=4) (**Tabla 13**).

Los patógenos responsables de coinfección más frecuentes en mujeres fueron: VPH 14.5% (n=9) y *Ureaplasma spp.* 4.8% (n=3). No se detectaron casos positivos a HSV 1 y 2, *Neisseria gonorrhoeae* y *Trichomonas vaginalis* (**Tabla 13**).

En hombres, los más frecuentes fueron: VPH 22.6% (n=14) y *Haemophilus spp.* 16.1 (n=19) (**Tabla 13**). Al comparar la prevalencia de los patógenos incluidos en el estudio con respecto al sexo del paciente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p>0.05$) (**Tabla 13**).

Tabla 13: Frecuencia de patógenos en coinfección según el sexo de la población de estudio (n=62)							
Microorganismo	Femenino		Masculino		Total		Valor de p
	n	%	n	%	n	%	
<i>Ureaplasma spp.</i>							
Positivo	3	4.8	5	8.1	8	12.9	0.862 (NS)
Negativo	22	35.5	32	51.6	54	87.1	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>							
Positivo	0	0.0	4	6.5	4	6.5	0.089 (NS)
Negativo	25	40.3	33	53.2	58	93.5	-
<i>Mycoplasma spp.</i>							
Positivo	0	0.0	3	4.8	3	4.8	0.144 (NS)

Negativo	25	40.3	34	54.8	59	95.2	-
MCV							
Positivo	0	0.0	3	4.8	3	4.8	0.144 (NS)
Negativo	25	40.3	34	54.8	59	95.2	-
<i>Treponema pallidum</i>							
Positivo	0	0.0	1	1.6	1	1.6	0.407 (NS)
Negativo	25	40.3	36	58.1	61	98.4	-
<i>Haemophilus spp.</i>							
Positivo	2	3.2	10	16.1	12	19.4	0.063 (NS)
Negativo	23	37.1	27	43.5	50	80.6	-
<i>Staphylococcus aureus</i>							
Positivo	0	0.0	1	1.6	1	1.6	0.407 (NS)
Negativo	25	40.3	36	58.1	61	98.4	-
VPH							
Positivo	9	14.5	14	22.6	23	37.1	0.883 (NS)
Negativo	16	25.8	23	37.1	39	62.9	-

Nota: Abreviaturas: VPH, Virus de Papiloma Humano; MCV, Virus del Molusco Contagioso; NS, no significativo.

La prueba de χ^2 se usó para comparar entre los grupos.

Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

La frecuencia de casos positivos a alguna especie de *Candida* + *Ureaplasma spp.* fue de 12.9% (n=8) (**Gráfico 16**).

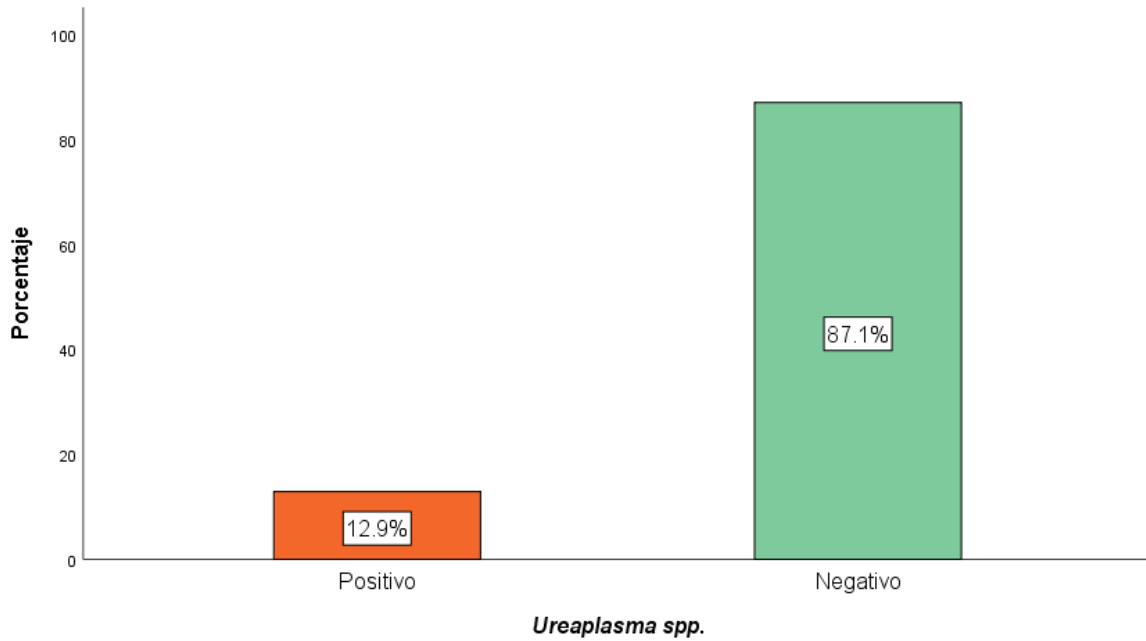


Gráfico 16. Frecuencia *Ureaplasma spp.* en la población de estudio.

La frecuencia de casos positivos a alguna especie de *Candida* + *Chlamydia trachomatis* fue de 6.5 % (n=4) (**Gráfico 17**).

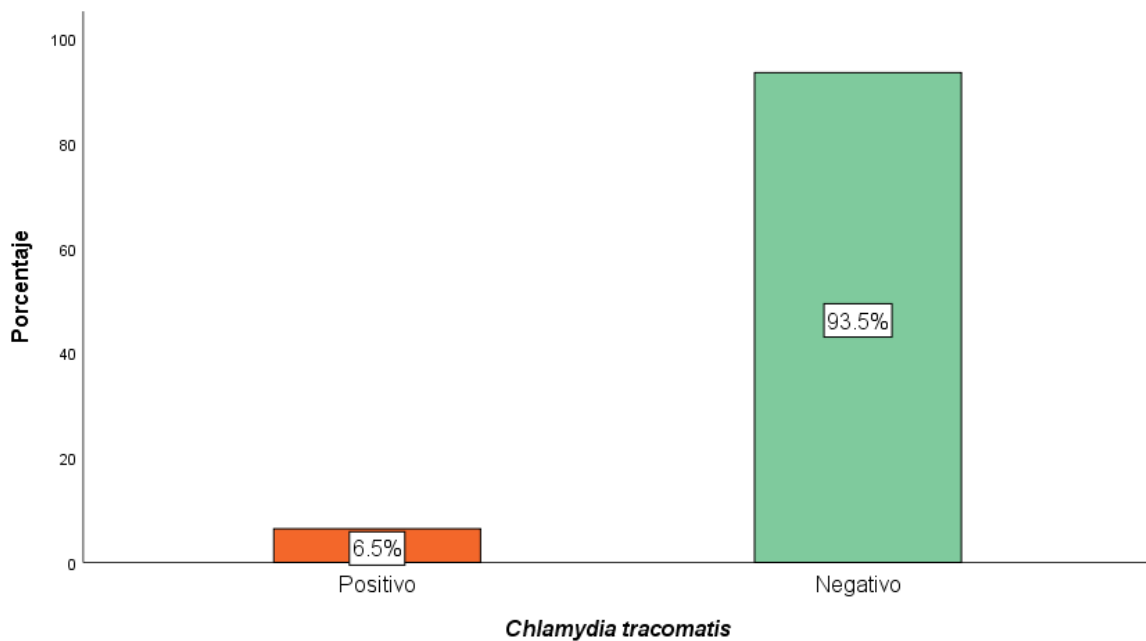


Gráfico 17. Frecuencia *Chlamydia trachomatis* en la población de estudio.

La frecuencia de casos positivos a alguna especie de *Candida* + *Mycoplasma spp.* fue de 4.8 % (n=3) (**Gráfico 18**).

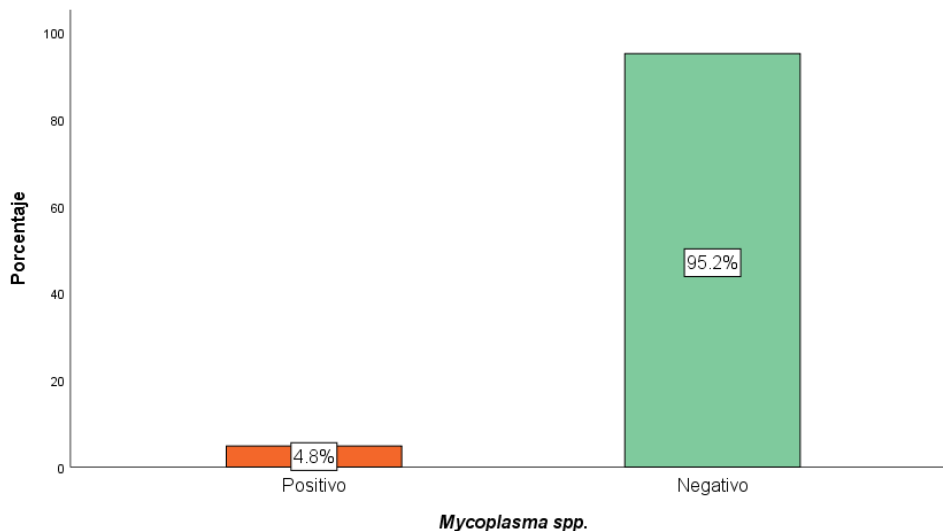


Gráfico 18. Frecuencia *Mycoplasma spp.* en la población de estudio.

La frecuencia de casos positivos a alguna especie de *Candida* + Virus del molusco contagioso (MCV) fue de 4.8 % (n=3) (**Gráfico 19**).

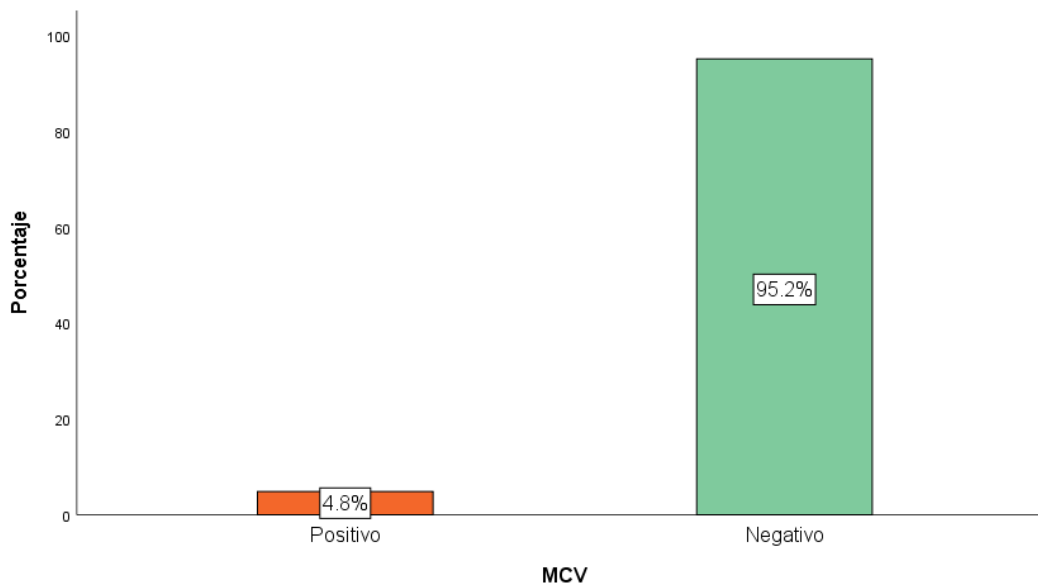


Gráfico 19. Frecuencia MCV en la población de estudio.

La frecuencia de casos positivos a alguna especie de *Candida* + *Treponema pallidum* fue de 1.6 % (n=1) (**Gráfico 20**).

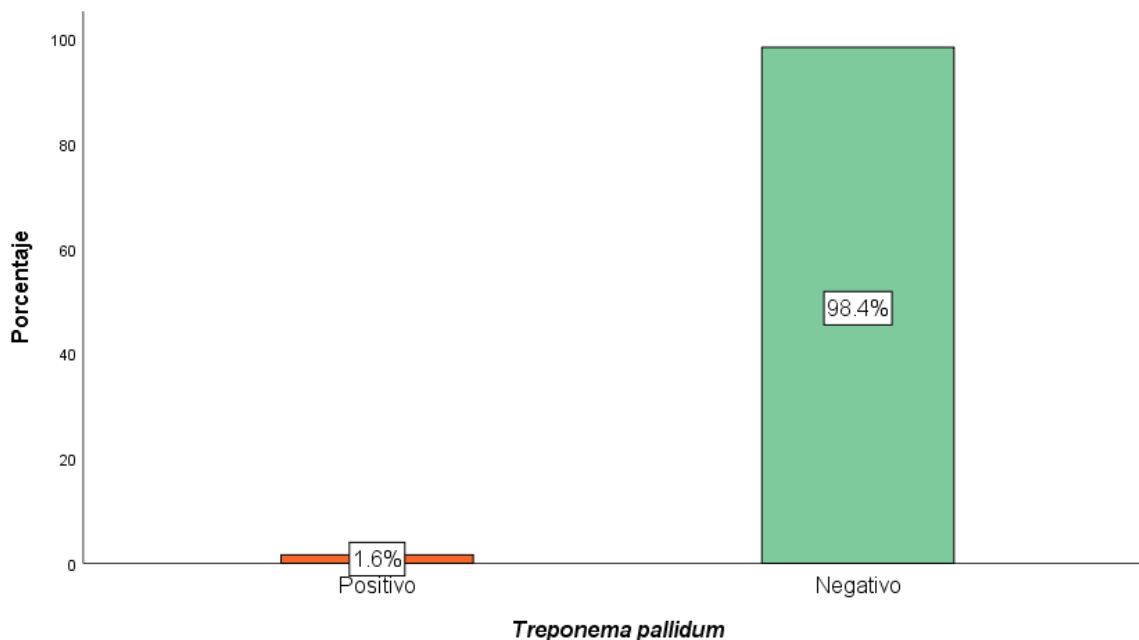


Gráfico 20. Frecuencia *Treponema pallidum* en la población de estudio.

La frecuencia de casos positivos a alguna especie de *Candida* + *Haemophilus spp.* fue de 19.4 % (n=12) (**Gráfico 21**).

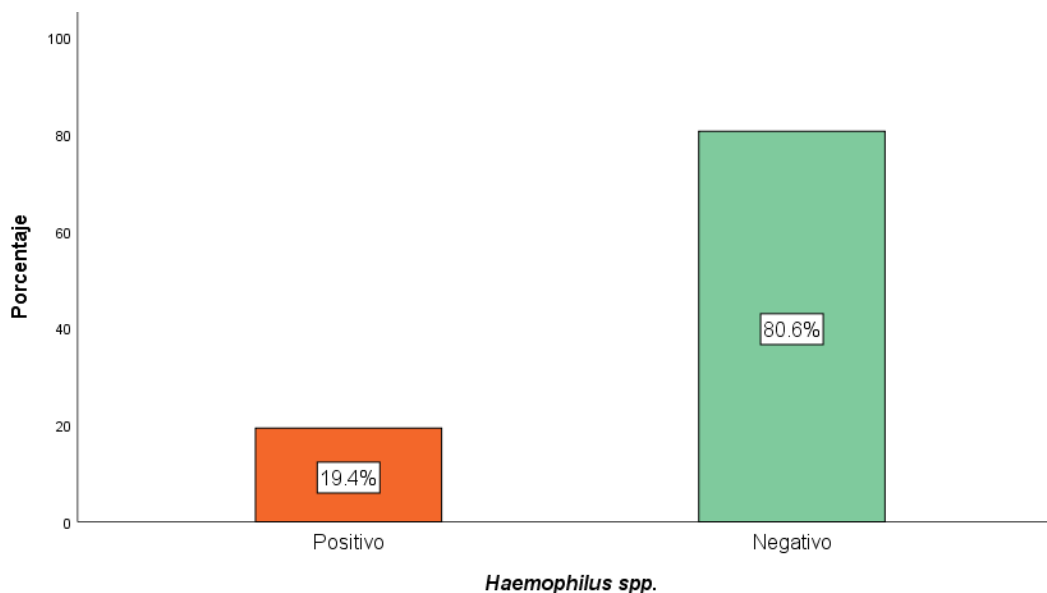


Gráfico 21. Frecuencia *Haemophilus spp.* en la población de estudio.

La frecuencia de casos positivos a alguna especie de *Candida* + *Staphylococcus aureus* fue de 1.6 % (n=1) (**Gráfico 22**).

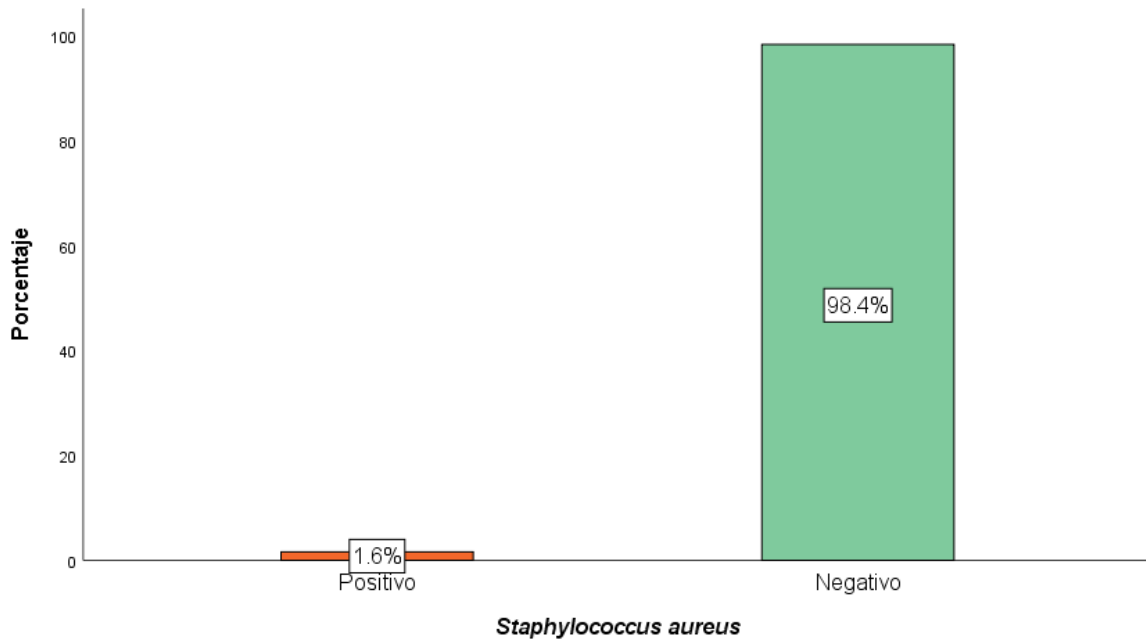


Gráfico 22. Frecuencia de *Staphylococcus aureus* en la población de estudio.

La frecuencia de casos positivos a alguna especie de *Candida* + genotipos del Virus de papiloma humano fue de 37.1% (n=23) (**Gráfico 23**).

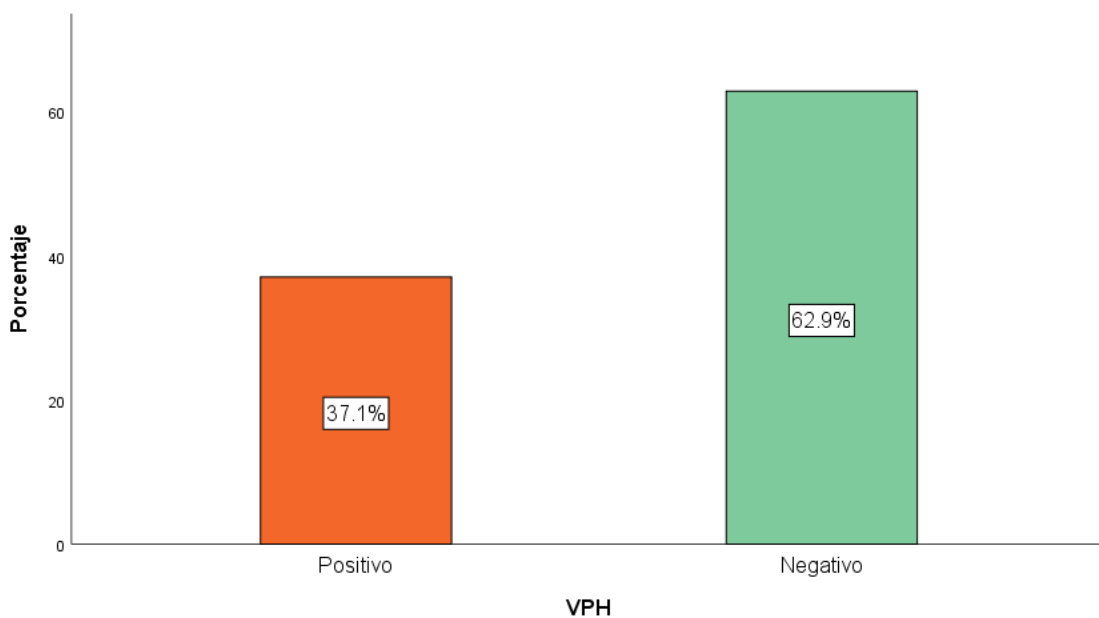


Gráfico 23. Frecuencia del Virus de Papiloma Humano en la población de estudio.

- **ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN Y RIESGO DE COINFECCIÓN CON CANDIDA POR DIFERENTES PATÓGENOS**

La asociación de *Candida albicans* con diferentes patógenos responsables de algunos casos de coinfección se muestra en la **Tabla 14**.

Nuestros hallazgos más relevantes, demostraron que los patógenos que se asocian con mayor frecuencia a *Candida albicans* fueron el Virus de Papiloma Humano 25.8% (n=16), *Ureaplasma spp.* 3.2% (n=2), *Mycoplasma spp.* 3.2% (n=2), y *Haemophilus spp.* 3.2% (n=2) (**Tabla 14**).

Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre *Candida albicans* y *Haemophilus spp.*, y el resultado positivo de *Candida albicans* es un factor de protección contra la infección por *Haemophilus spp.* (OR=0.086; IC 95%=0.017-0.439; p=0.001) (**Tabla 14**).

Además, se observa una asociación entre *Candida albicans* y *Ureaplasma spp.* (p=0.001) y que un resultado positivo a *Candida albicans* representa también un factor de protección contra la infección por *Ureaplasma spp.* (OR=0.181; IC 95%=0.033-0.986) (**Tabla 14**).

Por último, se encuentra que los casos de *Candida parapsilosis* no se asociaron significativamente a la infección por alguno de los patógenos evaluados en nuestro estudio (P>0.05).

Solo se tuvieron 2 casos de coinfección de *C. parapsilosis* con VPH (3.2%), un caso de coinfección de *C. parapsilosis* y *Ureaplasma spp.* (1.6%) y un caso de coinfección de *C. parapsilosis* y MCV (1.6%).

Tabla 14. Asociación y riesgo de infección por patógenos en coinfección con <i>Candida albicans</i> (n=62)				
Microorganismo	<i>Candida albicans</i> *	OR	IC 95%	Valor de p
<i>Ureaplasma spp.</i>				
Positivo	2 (3.2)	0.181	0.033-0.986	0.032
Negativo	35 (56.5)	-	-	-
<i>C. trachomatis</i>				
Positivo	2 (3.2)	0.657	0.086-5.000	0.683
Negativo	35 (56.5)	-	-	-
<i>Mycoplasma spp.</i>				
Positivo	1 (1.6)	0.319	0.027-3.727	0.340
Negativo	36 (58.1)	-	-	-
MCV				
Positivo	0 (0.0)	1.882	0.926-2.734	0.301
Negativo	37 (59.7)	-	-	-
<i>Treponema pallidum</i>				
Positivo	0 (0.0)	1.542	0.861-2.471	0.220
Negativo	37 (59.7)	-	-	-
<i>Haemophilus spp.</i>				
Positivo	2 (3.2)	0.086	0.017-0.439	0.001
Negativo	35 (56.5)	-	-	-
<i>S. aureus</i>				
Positivo	1 (1.6)	0.694	0.375-2.089	0.407
Negativo	36 (58.1)	-	-	-
VPH				
Positivo	16 (25.8)	1.959	0.660-5.819	0.223
Negativo	21 (33.9)	-	-	-

Nota: Abreviaturas: VPH, Virus del papiloma humano; MCV, Virus del molusco contagioso; OR, Odd ratio; IC, Intervalo de Confianza.

*Los datos se muestran como frecuencias (%).

La prueba χ^2 se usó para comparar entre los grupos.

Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

DISCUSIÓN

La *Candida* es un hongo que cuenta con más de 150 especies, de las cuales solo un 33% afecta al ser humano en diferentes áreas anatómicas. Las principales especies que podemos encontrar son la *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, tomando en cuenta que es un hongo oportunista, este puede proliferar en aquellas áreas con el medio idóneo.

A pesar de que clínicamente se puede confundir con cualquier otra infección del área genital, ya que la *Candida* no presenta ningún signo patognomónico, es importante determinar la causa de esta infección ya que en muchas ocasiones el tratamiento fracasa, puesto que cada especie responde a diferentes tratamientos antifúngicos. Esto tiene su origen en el abuso en la prescripción de fármacos de amplio espectro, generando una falta de respuesta favorable (Arastehfar, A., Fang, W., Pan, W., *et al.*, 2018). Aunado a esto, es importante conocer las múltiples resistencias a candidosis para otorgar el tratamiento más adecuado; por lo tanto, las estrategias de biología molecular caracterizadas por una alta especificidad, robustez y repetibilidad, permitirán la detección de las especies, e incluso genes de resistencia. El objetivo principal de este estudio, se centró en demostrar que la detección múltiple en una sola reacción de tres especies de *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* mediante técnica de PCR, cumple con los parámetros de validación inicial como son la especificidad, robustez, y repetibilidad, indispensable para la implementación de estrategias diagnósticas.

Diversos reportes han documentado que *C. albicans* es la principal especie encontrada en todas las áreas anatómicas habituales, al igual que demuestran nuestros hallazgos, y que es el motivo por el cual no se hace una búsqueda intencionada de *Candida spp*; tal es el caso del área genital. Aunque son pocos los reportes en esta área, la mayor frecuencia de estas patologías urogenitales es en mujeres, esto no solo en áreas de México si no de forma global; donde *C.*

albicans es el centro de atención y detección; presentando en segundo lugar *C. glabrata*. Nuestros hallazgos, por el contrario, han demostrado que la mayor frecuencia de este patógeno se reporta en hombres, en uretra principalmente, ya que se relaciona con casos de uretritis (Behzadi, P., Behzadi, E., & Ranjbar, R. I., 2015), demostrando la importancia de su detección. Otro de los hallazgos interesantes de nuestro trabajo fue la detección de más de una especie de *Candida*, ya que recordemos es un hongo oportunista, por lo cual se puede desarrollar en medios hostiles, y la mayoría de los pacientes que desarrollan candidosis son pacientes inmunocomprometidos por lo cual las infecciones micóticas pueden aumentar la disfuncionalidad el sistema inmune y desarrollarse más de una especie (Achkar, J. M., & Fries, B. C., 2010).

En el caso de la *C. parapsilosis*, su estadística es variable ya que en algunos lugares como Latinoamérica es considerada la tercera especie común, mientras que, en lugares como la India, algunas de estas especies de *Candida* han ocupado ya el primer lugar en combinación con otras como *Candida auris*, asociada con patologías, además de urogenitales, en coinfección SARS-CoV-2 y enfermedades cardiovasculares (Chowdhary, A., Tarai, B., Singh, A., & Sharma, A., 2020).

El reporte de casos positivos a candidosis en hombres es escaso, ya que no se hace la búsqueda de *Candida spp* en cuadros clínicos sugestivos principalmente cuando se sospecha de contactos sexuales de riesgo o cuando se presenta una balanitis, por lo que se inicia tratamiento sin demostrar la especie implicada, por lo cual puede conducir a una falta de respuesta favorable al antimicrobiano. Estas resistencias no solo podemos encontrarlas en los hombres, también podemos encontrar remisiones o fallas en el tratamiento en las mujeres por la falta de conocimiento de la especie implicada en el cuadro, respaldando la necesidad de una búsqueda intencionada por respuesta diferente a cada medicamento (Colombo, A. L., Júnior, J., & Guinea, J., 2017).

Otro de nuestros hallazgos interesantes fue que la edad media de mujeres fue de 32.0 ± 5.5 años y de hombres fue de 36.8 ± 1.9 años. En el caso de las mujeres, se ha reportado que el 70% de ellas ha tenido un episodio de *Candida* al menos una vez en su vida entre las edades de 20 a 40 años (Sánchez-Hernández JA, Rivera-Tapia JA & Coyotécatl-García LL., 2009), y en caso de los hombres hay una mayor incidencia a los 40 años de presentar infecciones producidas por *Candida*; (Lisboa, C., Santos, A., Dias, C., Azevedo, F., Pina-Vaz, C., & Rodrigues, A., 2010) la edad es un punto clave para realizar una búsqueda intencionada de ITS.

La detección de especies de *Candida* es variable en distintas poblaciones. En nuestro estudio, demostramos que más del 50% de las muestras fue positiva a alguna especie de *Candida*; por mencionar una población, en otra región mexicana, se detectó una frecuencia 50% menor, lo cual es muy interesante, ya que compartimos un trasfondo genético similar (Sánchez-Hernández JA, Rivera-Tapia JA & Coyotécatl-García LL., 2009). En otros antecedentes de Latinoamérica, se ha reportado una frecuencia similar por *Candida spp.* (Siri, L, Legarraga, P, García, P, González, *et al.*, 2017).

La frecuencia de los patógenos en coinfección con *Candida* también es un tema muy relevante, ya que la microbiota en cada mucosa es un compilado único y variable en convivencia y ecología en constante búsqueda de equilibrio; en nuestro trabajo, hemos reportado que las coinfecciones más frecuentes fueron: VPH, *Haemophilus spp*, *Ureaplasma spp*, y *Chlamydia trachomatis*. Diversos estudios han demostrado que la presencia de otros microorganismos son factores de riesgo que pueden ocasionar enfermedades crónicas que impactan la vida sexual y reproductiva de los pacientes (Lv, P., Zhao, F., Xu, X., *et al.*, 2019). En otros estudios se ha demostrado que la presencia de ciertos patógenos como *Ureaplasmas*, representa un factor de protección, puesto que es necesario el equilibrio ecológico de ambos patógenos para mantener las condiciones microambientales y mantener una proliferación saludable en esa zona anatómica

(Lv, P., Zhao, F., Xu, X., *et al.*, 2019). Más allá, la coinfección depende de la adherencia que presenta cada especie de *Candida*, la cual puede dar como consecuencia las infecciones mixtas presentando varias especies de *Candida* y algunas con otros patógenos (Osawa, K., Shigemura, K., Yoshida, H. *et al.*, 2013). Finalmente, además de los hallazgos clínicos y epidemiológicos, nuestro trabajo está enfocado en demostrar que el desarrollo tecnológico es indispensable para mejorar la resolución de las enfermedades y, en consecuencia, la estabilidad física y emocional de los pacientes.

CONCLUSIÓN

Nuestro proyecto permitió demostrar y aceptar nuestra hipótesis, puesto que es factible la detección de las tres especies de *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* en una sola reacción utilizando los parámetros de especificidad, repetibilidad y robustez, planteada para el desarrollo del proyecto.

Por lo tanto, este trabajo respalda la necesidad de una búsqueda intencionada y específica de este hongo, con el objetivo de mejorar los tratamientos y disminuir de manera importante las resistencias a los tratamientos y mejorar la calidad de vida de los pacientes, mediante técnicas asequibles y de frontera.

PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Para continuar esta línea de experimentación, validación y aplicación clínica, es necesario continuar con el desarrollo de paneles más extensos que permitan detectar una amplia variedad de estos hongos. Por lo tanto, nuestra propuesta es incrementar la detección de tres a siete especies de *Candida* para aplicar esta metodología en su búsqueda en distintas mucosas y cavidades corporales, tanto humano como animales.

LIMITACIONES DEL PROYECTO

Las limitantes del proyecto principalmente fueron los recursos financieros, ya que inicialmente buscábamos realizar un panel con más especies de *Candida*, pero debido a falta de este presupuesto, disminuimos el panel a 3 especies.

REFERENCIAS

1. Achkar, J. M., & Fries, B. C. (2010). Candida infections of the genitourinary tract. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 253–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00076-0>
2. Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schäffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* 24:1757-1764.
3. Alburquenque, Claudio, Beltrán, Sebastián, Olivares, Roberto, Falconer, Mary A, Amaro, José, Fuentes, Marisol, & Tapia, Cecilia V. (2013). Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp: la importancia de vigilar también cepas de la comunidad. *Revista chilena de infectología*, 30(3), 244-251. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000300002>
4. Alves, C. T., Wei, X. Q., Silva, S., Azeredo, J., Henriques, M., & Williams, D. W. (2014). *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. *The Journal of infection*, 69(4), 396–407. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.06.00>.
5. Arastehfar, A., Fang, W., Pan, W., Liao, W., Yan, L., & Boekhout, T. (2018). Identification of nine cryptic species of *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis* complexes using one-step multiplex PCR. *BMC infectious diseases*, 18(1), 480. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3381-5>
6. Asmah RH, Blankson HNA, Seanefu KA, Obeng-Nkrumah N, Awuah-Mensah G, Cham M, et al. Trichomoniasis and associated co-infections of the genital tract among pregnant women presenting at two hospitals in Ghana. *BMC Womens Health*. 17(1):130. Epub 2017/12/15. doi: 10.1186/s12905-017-0489-5 10.1186/s12905-017-0489-5 [pii]. PubMed PMID: 29237446; PubMed Central PMCID: PMC572929.

7. Behzadi, P., Behzadi, E., & Ranjbar, R. (2015). Urinary tract infections and *Candida albicans*. *Central European journal of urology*, 68(1), 96–101. <https://doi.org/10.5173/ceju.2015.01.474>
8. Bernabé, P., Becherán, L., Cabrera-Barjas, G., Nesic, A., Alburquenque, C., Tapia, C. V., Taboada, E., Alderete, J., & De Los Ríos, P. (2020). Chilean crab (*Aegla cholchol*) as a new source of chitin and chitosan with antifungal properties against *Candida* spp. *International journal of biological macromolecules*, 149, 962–975. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.126>
9. Blake DR, Maldeis N, Barnes MR, Hardick A, Quinn TC, Gaydos CA. Cost-effectiveness of screening strategies for *Chlamydia trachomatis* using cervical swabs, urine, and self-obtained vaginal swabs in a sexually transmitted disease clinic setting. *Sex Transm Dis*. 2008;35(7):649-55. Epub 2008/05/08. doi: 10.1097/OLQ.0b013e31816ddb9a. PubMed PMID: 18461013; PubMed Central PMCID: PMC2711851.
10. Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 9(7), 327–335. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02094-7).
11. Camacho-Cardoso, J. L., Martínez-Rivera, M. Á., Manzano-Gayosso, P., Méndez-Tovar, L. J., López-Martínez, R., & Hernández-Hernández, F. (2017). Detección molecular de especies de *Candida* en especímenes de pacientes hospitalizados [Molecular detection of candida species from hospitalized patient's specimens]. *Gaceta medica de Mexico*, 153(5), 581–589. <https://doi.org/10.24875/GMM.17002535>
12. Cámara de diputados del h. congreso de la unión. (2014). reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud. Febrero 23, 2021, de Secretaría de Servicios Parlamentarios Sitio web: http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LGS_MIS.pdf.
13. Chowdhary, A., Tarai, B., Singh, A., & Sharma, A. (2020). Multidrug-Resistant *Candida auris* Infections in Critically Ill Coronavirus Disease

- Patients, India, April-July 2020. *Emerging infectious diseases*, 26(11), 2694–2696. <https://doi.org/10.3201/eid2611.203504>
14. Coleman JS, Gaydos CA, Witter F. *Trichomonas vaginalis* vaginitis in obstetrics and gynecology practice: new concepts and controversies. *Obstet Gynecol Surv.* 68(1):43-50. Epub 2013/01/17. doi: 10.1097/OGX.0b013e318279fb7d. PubMed PMID: 23322080; PubMed Central PMCID: PMC358627
 15. Colombo, A. L., Júnior, J., & Guinea, J. (2017). Emerging multidrug-resistant *Candida* species. *Current opinion in infectious diseases*, 30(6), 528–538. <https://doi.org/10.1097/QCO.000000000000041>
 16. Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microbial pathogenesis*, 117, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>
 17. de la Paz Castillo, Katia Leonor, Proenza Fernández, Leydis, Gallardo Sánchez, Yurieth, Fernández Pérez, Suzel, & Mompié Lastre, Agustina. (2012). Factores de riesgo en adultos mayores con diabetes mellitus. *MEDISAN*, 16(4), 489-497. Recuperado en 20 de julio de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192012000400001&lng=es&tlng=es.
 18. Diba, K., Makhdoomi, K., Nasri, E., Vaezi, A., Javidnia, J., Gharabagh, D. J., Fakhim, H. (2018). Emerging *Candida* species isolated from renal transplant recipients: Species distribution and susceptibility profiles. *Microbial Pathogenesis*. doi:10.1016/j.micpath.2018.09.02
 19. Díez, M., & Díaz, A.. (2011). Infecciones de transmisión sexual: epidemiología y control. *Revista Española de Sanidad Penitenciaria*, 13(2), 58-66. Recuperado en 10 de febrero de 2021, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1575-06202011000200005&lng=es&tlng=es.

20. Douglas LJ. Candida biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003 Jan;11(1):30-6. doi: 10.1016/s0966-842x(02)00002-1. PMID: 12526852.
21. Eggimann, P., & Pittet, D. (2014). Candida colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients: 20 years later. *Intensive care medicine*, 40(10), 1429–1448. <https://doi.org/10.1007/s00134-014-3355>
22. Elicharova, H., Herynkova, P., Zimmermannova, O., & Sychrova, H. (2019). Potassium uptake systems of *Candida krusei*. *Yeast (Chichester, England)*, 36(7), 439–448. <https://doi.org/10.1002/yea.3396>
23. Fakhim, H., Vaezi, A., Javidnia, J., Nasri, E., Mahdi, D., Diba, K., & Badali, H. (2020). *Candida africana* vulvovaginitis: Prevalence and geographical distribution. *Journal de mycologie medicale*, 30(3), 100966. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.100966>.
24. Fisher, J. F., Kavanagh, K., Sobel, J. D., Kauffman, C. A., & Newman, C. A. (2011). Candida urinary tract infection: pathogenesis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52 Suppl 6, S437–S451. <https://doi.org/10.1093/cid/cir110>.
25. Guilarte C., Pardi G., Perrone M. (2011). Deteccion de especies de *Candida* en agar *Candida* cromogenico, a partir de cepas aisladas de muestras de cavidad bucal, *Acta odontológica venezolana* 49 (4)
26. Guinea J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20 Suppl 6, 5–10. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12539>
27. Hu, L., He, C., Zhao, C., Chen, X., Hua, H., & Yan, Z. (2019). Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases. *Microbial pathogenesis*, 134, 103575. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103575>

28. Huo, H. F., Yang, Q., & Xiang, H. (2019). Dynamics of an edge-based SEIR model for sexually transmitted diseases. *Mathematical biosciences and engineering : MBE*, 17(1), 669–699. <https://doi.org/10.3934/mbe.2020035>.
29. Kouri, A. M., Kieffer, T. W., Nailescu, C., Leiser, J., Schmitt, B. H., Relich, R. F., Davis, T. E., & Manaloor, J. J. (2020). Evaluation of T2Candida Panel for detection of Candida in peritoneal dialysates. *Peritoneal dialysis international: journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, 40(1), 96–99. <https://doi.org/10.1177/0896860819879874>
30. Kovachev, S. M., & Vatcheva-Dobrevska, R. S. (2015). Local Probiotic Therapy for Vaginal Candida albicans Infections. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 7(1), 38–44. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9176-0>.
31. Lavazzo, C., Gkegkes, I. D., Zarkada, I. M., & Falagas, M. E. (2011). Boric acid for recurrent vulvovaginal candidiasis: the clinical evidence. *Journal of women's health (2002)*, 20(8), 1245–1255. <https://doi.org/10.1089/jwh.2010.2708>.
32. Lazo, Víctor, Hernández, Gina, & Méndez, Rafael. (2018). Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horizonte Médico (Lima)*, 18(1), 75-85. <https://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n1.11>
33. Lisboa, C., Santos, A., Dias, C., Azevedo, F., Pina-Vaz, C., & Rodrigues, A. (2010). Candida balanitis: risk factors. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 24(7), 820–826. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03533.x>
34. Lobaina Rodríguez, Tamara, Zhurbenko, Raisa, Rodríguez Martínez, Claudio, Zayas Ruíz, Yordania, & Rodríguez Rodríguez, Ailen. (2010). Identificación de especies de Candida de importancia clínica con un método auxonograma modificado. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 62(1), 66-81. Recuperado en 20 de julio de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602010000100008&lng=es&tlng=es


35. Lv, P., Zhao, F., Xu, X., Xu, J., Wang, Q., & Zhao, Z. (2019). Correlation between Common Lower Genital Tract Microbes and High-Risk Human Papillomavirus Infection. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 2019, 9678104. <https://doi.org/10.1155/2019/9678104>
36. Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>.
37. Miró, M. S., Rodríguez, E., Vigezzi, C., Icely, P. A., Gonzaga de Freitas Araújo, M., Riera, F. Sotomayor, C. E. (2017). Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(2), 65–71. doi:10.1016/j.riam.2016.11.006
38. Murillo, P., Cortés, A., Uribarren, T.N.J., Catañeda L. R. (2017). Candidiasis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países Latinoamericanos. *Revista Mesica Risaralda* 23(1), 38-44,
39. Nguyen, A., & Holland, A. (2020). Balanitis xerotica obliterans: an update for clinicians. *European journal of pediatrics*, 179(1), 9–16. <https://doi.org/10.1007/s00431-019-03516-3>
40. Osawa, K., Shigemura, K., Yoshida, H., Fujisawa, M., & Arakawa, S. (2013). *Candida* urinary tract infection and *Candida* species susceptibilities to antifungal agents. *The Journal of antibiotics*, 66(11), 651–654. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.68>
41. Pais, P., Galocha, M., Viana, R., Cavalheiro, M., Pereira, D., & Teixeira, M. C. (2019). Microevolution of the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* during antifungal therapy and host infection. *Microbial cell (Graz, Austria)*, 6(3), 142–159. <https://doi.org/10.15698/mic2019.03.670>.
42. Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18026. doi:10.1038/nrdp.2018.26
43. REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: Diccionario de la lengua española, 23.^a ed., [versión 23.4 en línea]. <<https://dle.rae.es>> 07 Septiembre, 2021

44. Reyes-Montes, M., Acosta-Altamirano, G., Duarte-Escalante, E., Salazar, E. G., Martínez-Herrera, E., Arenas, R., González, G., & Frías-De-León, M. G. (2019). Usefulness of a multiplex PCR for the rapid identification of *Candida glabrata* species complex in Mexican clinical isolates. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 61, e37. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961037>.
45. Sierra-Díaz, E., Hernández-Ríos, C. J., & Bravo-Cuellar, A. (2019). Antibiotic resistance: Microbiological profile of urinary tract infections in Mexico. Resistencia a antibióticos: Perfil microbiológico de las infecciones de vías urinarias en México. *Cirugía y cirujanos*, 87(2), 176–182. <https://doi.org/10.24875/CIRU.18000494>
46. Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 288–305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278>.
47. Sánchez-Hernández JA, Rivera-Tapia JA, Coyotécatl-García LL, et al. Incidencia de *Candida albicans* en pacientes estudiadas en la Ciudad de Puebla, México. *Acta Cient Estud*. 2009;7(3):191-195.
48. Siri, Leonardo, Legarraga, Paulette, García, Patricia, González, Tamara, & Rabagliati, Ricardo. (2017). Cambios clínicos y epidemiológicos de candidemias en pacientes adultos desde 2000 a 2013. *Revista chilena de infectología*, 34(1), 19-26. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000100003>.
49. Spreghini, E., Maida, C. M., Tomassetti, S., Orlando, F., Giannini, D., Milici, M. E., Scalise, G., & Barchiesi, F. (2008). Posaconazole against *Candida glabrata* isolates with various susceptibilities to fluconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(6), 1929–1933. <https://doi.org/10.1128/AAC.00130-08>
50. Taira, C.L., Okay, T.S., Delgado, A.F. et al. A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically


- ill paediatric patients. *BMC Infect Dis* 14, 406 (2014). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-406>
51. Tapia P, Cecilia. (2008). *Candida glabrata*. *Revista chilena de infectología*, 25(4), 293. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182008000400009>.
52. Tóth, R., Nosek, J., Mora-Montes, H. M., Gabaldon, T., Bliss, J. M., Nosanchuk, J. D., Turner, S. A., Butler, G., Vágvölgyi, C., & Gácsér, A. (2019). *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. *Clinical microbiology reviews*, 32(2), e00111-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-18>
53. Wawrysiuk, S., Rechberger, T., Futyma, K., & Miotła, P. (2018). *Candida lusitanae* - a case report of an intraperitoneal infection. *Przegląd menopauzalny = Menopause review*, 17(2), 94–96. <https://doi.org/10.5114/pm.2018.77310>
54. Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14
55. Zuza-Alves, D. L., Silva-Rocha, W. P., & Chaves, G. M. (2017). An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. *Frontiers in microbiology*, 8, 1927. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01927>.
-

ANEXOS

Consentimiento informado



SOLICITUD DE SERVICIOS

#Solicitud: _____ #Muestra: 

Instrucciones: Por favor, lea y llene con **letra legible** todos los campos; **son obligatorios**. La falta de información puede retrasar el análisis de la muestra.

centraladn

Datos del solicitante

Nombre (Empresa/ Nombre y Apellidos): _____
Teléfono (s): _____ Correo electrónico: _____

Información del paciente

Nombre: _____ Fecha de nacimiento: 27 a Género: M F
Motivo del análisis: Infección persistente y/o Ardor

Datos de la muestra

Tipo de muestra: Hisopado Depilado Sangre Especifique otro: _____
Sitio anatómico de toma: Cervix Fecha de toma de muestra: 27-10-2020

Seleccione el tipo de estudio

<p>Urología/Ginecología/ Obstetricia</p> <p><input type="radio"/> VPH (Virus del papiloma humano) 18 VPH-AR y 6 VPH-BR</p> <p><input checked="" type="radio"/> ETS Básico: <i>Candida spp., Ureaplasma spp., Trichomonas vaginalis, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma spp., Virus Herpes tipo 1 y 2.</i></p> <p><input type="radio"/> ETS Complementario: Virus Herpes tipo 1 y 2, Virus del molusco contagioso, <i>Klebsiella spp., Treponema pallidum, Haemophilus ducreyi, Haemophilus spp., Staphylococcus aureus.</i></p> <p><input type="radio"/> ETS Completo (básico + complementario)</p> <p><input type="radio"/> Panel de Enfermedad Pélvica Inflamatoria: <i>Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium, Neisseria gonorrhoeae, Ureaplasma parvum, Ureaplasma urealyticum, Atopobium vaginae.</i></p> <p><input type="radio"/> Detección de <i>Chlamydia trachomatis</i></p>	<p>Oncogenómica</p> <p><input type="radio"/> Genes BRCA 1 y 2 (Secuenciación e INDELS)</p> <p><input type="radio"/> Panel hereditario de 32 genes para riesgo de cáncer de mama, ovario, endometrio, páncreas, colon, renal.</p> <p>Farmacogenómica</p> <p><input type="radio"/> Tamizaje metabólico Multifarmacia PGT: qué tipo de medicamentos son los más apropiados para un paciente.</p> <p>Biología de la reproducción</p> <p><input type="radio"/> MaternIT Genome: analiza por completo los 23 pares de cromosomas fetales.</p> <p><input type="radio"/> Tamiz Neonatal Genómico BabyGenes. Diagnóstico de 71 condiciones metabólicas.</p> <p>Nutrición y bienestar</p> <p><input type="radio"/> Brain Power: analiza tu predisposición genética para desarrollar alzheimer, parkinson, depresión, entre otros</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Si usted requiere otro estudio, consulte el catálogo de servicios en extenso 2019.
Nombre del análisis: _____

Consentimiento: Autorizo a Central ADN S.A. de C.V. llevar a cabo los estudios solicitados en este formato y acepto las condiciones y términos de la empresa. La toma de las muestras es ajena a Central ADN por lo tanto el análisis estará condicionado a su viabilidad al ser recibidas en el laboratorio. Del mismo modo autorizo que el material genético (ADN/SARNE) solamente sea utilizado en investigación y fines de control y mejoramiento de la calidad de las pruebas en salud humana, siempre que sea anonimada por Central ADN S.A. de C.V. Comprendo que mi muestra (ceñal, biopsia o líquido corporal) será desechada 1 mes posterior a la emisión del resultado.

Nombre y firma del Solicitante y/o Paciente o tutor: _____ Fecha: 27-10-2020
En caso de ser menor de edad, por favor, se requiere firma del padre o tutor o adjuntar la solicitud del médico tratante o carta responsiva.

LABORATORIO CENTRAL ADN: Antigua Carretera a Pátzcuaro Km 2 Col. Ex Hacienda San José de la Huerta C.P. 58541 Morelia, Michoacán Tel 4433201140, www.centraladn.com

Autoridad emisora: Coordinador de calidad Página 1 de 1 PC-30-25 edB